

Regulation des Serotoninrezeptor-3B-Gens: Gewebespezifische Transkription
und funktionelle Analyse genetischer Polymorphismen

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Cornelia Meineke

aus Freiburg im Breisgau

1. Referent: Professor Dr. Ingo Rustenbeck
2. Referent: Professor Dr. Jürgen Brockmüller
eingereicht am: 31.07.2006
mündliche Prüfung (Disputation) am: 20.12.2006

Druckjahr 2007

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Eingereichte Publikation

Tzvetkov, MV. & Meineke, C., Oetjen E., Hirsch-Ernst K., Brockmüller J.
TISSUE-SPECIFIC ALTERNATIVE PROMOTERS OF SEROTONIN RECEPTOR GENE
HTR3B IN HUMAN BRAIN AND INTESTINE
Journal: Gene

Tagungsbeiträge

Meineke C., Tzvetkov MV., Kaiser R., Oetjen E., Hirsch-Ernst K., Brockmüller J:
FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF A 3 BASE PAIR POLYMORPHISM IN THE
SEROTONIN-3B-RECEPTOR GENE: (Poster)
International Symposium des Graduiertenkollegs 1034 der Deutschen
Forschungsgemeinschaft, Göttingen (2006)

und

Meineke C., Tzvetkov MV., Kaiser R., Oetjen E., Hirsch-Ernst K., Brockmüller J:
FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF A 3-BASE PAIR POLYMORPHISM IN THE
HTR3B RECEPTOR GENE. (Abstrakt) eingereicht für die Jahrestagung der Deutschen
Pharmazeutischen Gesellschaft (2006).

“Attempto!”

Eberhard im Barte (1445 – 1496)

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1 EINLEITUNG	1
1.1 Klinische Bedeutung von Übelkeit und Erbrechen.....	1
1.2 Pathophysiologie von Zytostatika-induzierter Übelkeit und Erbrechen	1
1.3 Pathophysiologie und Arzneitherapie gegen Erbrechen	4
1.4 Arzneitherapie von Zytostatika-induzierter Übelkeit und Erbrechen.....	5
1.5 Serotonin und seine Serotoninrezeptoren.....	6
1.6 Der Serotonin-3-Rezeptor	6
1.6.1 Aufbau des 5-HT ₃ -Rezeptors	6
1.6.2 Untereinheiten A und B des 5-HT ₃ -Rezeptors	6
1.6.3 Genregulation und gewebespezifische Expression der 5-HT _{3A} - und der 5-HT _{3B} -Untereinheit	6
1.7 Bedeutung angeborener genetischer Variabilität in der Arzneitherapie.....	6
1.8 Genetische Variabilität im 5-HT ₃ -Rezeptor	6
1.9 Medizinische Studien zum Einfluss von Varianten im HTR3A- und HTR3B-Gen	6
1.10 Aufgabenstellung	6
2 MATERIAL UND METHODEN.....	6
2.1 Material	6
2.1.1 Reagenzien, Kits, Medien und Enzyme	6
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	6
2.1.3 Geräte.....	6
2.1.4 Software, Datenbanken und Sequenzen	6
2.1.5 Biologisches Material	6
2.1.5.1 Zelllinien	6
2.1.5.2 Bakterienstämme	6
2.1.5.3 Vektoren	6
2.1.5.4 RNA-Präparate	6
2.1.5.5 Oligonukleotide (Hersteller: IBA, Göttingen/MWG-Biotech, Ebersberg)	6
2.1.5.6 Restriktionsenzyme	6
2.1.5.7 DNA	6
2.2 Methoden.....	6
2.2.1 Sterilität.....	6
2.2.2 Entsorgung von biologischem Material der Sicherheitsstufe S1	6
2.2.3 DNA Standardmethoden	6
2.2.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	6
2.2.3.2 DNA Isolation	6
2.2.3.3 Lagerung von DNA	6
2.2.3.4 DNA Quantifizierung	6
2.2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese	6

2.2.3.6	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen.....	6
2.2.4	Enzymatische Modifikationen von DNA.....	6
2.2.4.1	Restriktionsspaltung von DNA.....	6
2.2.4.2	Dephosphorylierung linearisierter DNA-Fragmente.....	6
2.2.4.3	Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden.....	6
2.2.4.4	Generieren von 5'-A-Überhängen an DNA-Fragmenten.....	6
2.2.5	Sequenzanalyse.....	6
2.2.5.1	Sequenzierung des Bereiches vor Exon 2 des HTR3B-Gens.....	6
2.2.6	RLM 5' RACE.....	6
2.2.7	Einführen von Varianten in Plasmidkonstrukte.....	6
2.2.8	Klonierung von DNA-Fragmenten.....	6
2.2.8.1	Ligation mit T4-DNA-Ligase.....	6
2.2.8.2	TOPO-Ligation.....	6
2.2.8.3	Klonierung der DNA-Abschnitte Promotor 1 und Promotor 2 in Luziferase-Reportergen-Vektoren.....	6
2.2.8.4	Klonierung der verkürzten Promotor-1-Luziferasekonstrukte.....	6
2.2.8.5	Klonierung der Tandem-Luziferasekonstrukte.....	6
2.2.8.6	Klonierung des offenen Leserahmens aus humaner Gehirn-mRNA.....	6
2.2.9	Arbeiten mit Bakterien.....	6
2.2.9.1	Kulturmedien für Bakterien.....	6
2.2.9.2	Anzucht von Bakterien in Lösung.....	6
2.2.9.3	Anzucht von Bakterien auf Agarplatten.....	6
2.2.9.4	Herstellung von Glycerinkryokulturen.....	6
2.2.9.5	Dichtebestimmung von Bakterienlösungen.....	6
2.2.9.6	Präparation chemisch-kompetenter Bakterien.....	6
2.2.9.7	Präparation von elektro-kompetenten Bakterien.....	6
2.2.9.8	Transformation durch Hitzeschock.....	6
2.2.9.9	Transformation durch Elektroporation.....	6
2.2.9.10	Kolonie-PCR.....	6
2.2.10	Zellkultur.....	6
2.2.10.1	Verwendete Zelllinien und Bedingungen.....	6
2.2.10.2	Revitalisieren von Zellen.....	6
2.2.10.3	Einfrieren von Zellen.....	6
2.2.10.4	Differenzierung von Zellen.....	6
2.2.10.5	Transfektion.....	6
2.2.10.6	Quantitative Luciferase-Messung.....	6
2.2.11	Arbeiten mit RNA.....	6
2.2.11.1	Isolation von RNA.....	6
2.2.11.2	Arbeiten mit und Aufbewahrung der RNA.....	6
2.2.11.3	cDNA Synthese.....	6
2.2.12	Genexpressionsmessungen mit qRT-PCR.....	6
2.2.12.1	Genexpressionsmessung mit SYBR Green.....	6
2.2.12.2	Genexpressionsmessung mit genspezifischen Sonden.....	6
2.2.12.3	Relative Quantifizierung.....	6
2.2.12.4	Absolute Quantifizierung.....	6
2.2.12.5	qRT-PCR zur Diskriminierung der mRNA Transkripte.....	6
2.2.13	Elektrophoretic Mobility Shift Assay.....	6
2.2.13.1	alpha- ³² P-markierte Sonden.....	6
2.2.13.2	Bindungsreaktion.....	6
2.2.13.3	Nicht-denaturierende Gelelektrophorese.....	6
2.2.13.4	Kompetition im EMSA.....	6
2.2.13.5	Quantitative Auswertung der Gelshiftbilder.....	6
2.2.13.6	Zellkernproteinisolierung.....	6
2.3	Bioinformatische Untersuchungen zur genetischen Kopplung.....	6
3	ERGEBNISSE.....	6
3.1	Expression von HTR3A und HTR3B.....	6
3.1.1	Expression in humanen Geweben.....	6
3.1.2	HTR3B-Expression in Zelllinien.....	6

3.2	Bestimmung der HTR3B-Transkriptionsstartpunkte	6
3.2.1	Identifizierung der Transkriptionsstartpunkte in primären Geweben.....	6
3.2.2	Identifizierung der Transkriptionsstartpunkte in der Gewebekultur	6
3.2.3	Voraussage der primären Proteinstruktur aufgrund der alternativen Transkripte	6
3.2.4	Bestätigung der Transkriptionsstartpunkte.....	6
3.2.5	Klonierung des offenen Leserahmens aus Gehirngewebs-mRNA	6
3.3	Promotorbereiche des HTR3B-Gens.....	6
3.3.1	Funktionelle Untersuchung des Promotorbereiches P1	6
3.3.2	Verkürzung des P1 Fragmentes	6
3.3.3	Genotypisierung des alternativen Promotorbereiches (P2)	6
3.3.4	Funktionelle Untersuchung des Promotorbereiches P2.....	6
3.4	Regulation der Expression von Htr3b/HTR3B durch Hormone, Zytokine und Arzneistoffe.....	6
3.5	Funktionelle Bedeutung des Deletionspolymorphismus.....	6
3.5.1	Funktionelle Untersuchung des Deletionspolymorphismus mittels Luziferase-Reporter-Gen Versuch 6	6
3.5.2	Tandemklonierung des Bereiches der Deletionsvariante	6
3.5.3	EMSA-Untersuchung.....	6
3.6	Ergänzende Bioinformatische Analysen	6
3.6.1	Bioinformatische Analysen zu Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen.....	6
3.6.2	Genetische Kopplung.....	6
4	DISKUSSION	6
4.1	Expression der HTR3A- und HTR3B-Untereinheit in menschlichen Geweben	6
4.2	Alternativer Transkriptionsstart des HTR3B-Gens im Gehirn	6
4.3	Promotorbereich P1 und P2.....	6
4.4	Einfluss von Glukokortikoiden auf die Genexpression	6
4.5	Bedeutung der -100/-102 Deletionsvariante.....	6
4.6	Genkopplung als mögliche Erklärung	6
4.7	Ausblick.....	6
5	ZUSAMMENFASSUNG	6
6	LITERATURVERZEICHNIS	6
7	ANHANG.....	6
7.1	Genomische DNA-Sequenz des HTR3B-Gens.....	6
7.2	Humane mRNA-Sequenz AF169255 und AF080582	6
7.3	Promotorregion der Ratte.....	6
LEBENS LAUF		6
DANKSAGUNG		6

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
5-HT _{3A}	Serotoninrezeptor 3A
5-HT _{3B}	Serotoninrezeptor 3B
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
bzw.	Beziehungsweise
ca.	<i>circa</i>
cDNA	<i>Copy DNA</i>
d-	Desoxy-
dCTP	Desoxy-Cytosintriphosphat
dd-	Didesoxy-
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii
FAM	6-Carboxyfluorescein
g	Erdbeschleunigung (9.81 m/s ²)
HEPES	<i>4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazine-1-ethanesulfonic acid</i>
HTR3A	Gen der Serotoninrezeptor 3-Untereinheit A
HTR3B	Gen der Serotoninrezeptor 3-Untereinheit B
kb	Kilobasenpaare
LB	Luria-Bertani Medium
LD	<i>linkage disequilibrium</i>
M	Molarität
mCPBG	1-(m-Chlorophenyl)-biguanide

MGB	<i>Minor Groove Binder</i>
mind.	Mindestens
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Messenger RNA
OD	Optische Dichte
P	Signifikanzniveau
p.a.	<i>pro analysi</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	pH-Wert
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium 1640</i>
RT	Raumtemperatur
SCB	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SV40	<i>Simian Virus 40</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBP	TATA-Box-bindendes Protein
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TE-Puffer	Tris-hydroxymethyl-aminomethan-EDTA-Puffer
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	<i>unit</i>
VIC	6-Carboxyrhodamin
z. B.	zum Beispiel

Code der Nukleinsäuren

Abkürzung	Bedeutung
A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

Code der Aminosäuren

Abkürzung	Bedeutung
A (Ala)	Alanin
C (Cys)	Cystein
D (Asp)	Asparaginsäure
E (Glu)	Glutaminsäure
F (Phe)	Phenylalanin
G (Gly)	Glycin
H (His)	Histidin
I (Ile)	Isoleucin
K (Lys)	Lysin
L (Leu)	Leucin
M (Met)	Methionin
N (Asn)	Asparagin
P (Pro)	Prolin
Q (Gln)	Glutamin
R (Arg)	Arginin
S (Ser)	Serin
T (Thr)	Threonin
V (Val)	Valin
W (Trp)	Tryptophan
Y (Tyr)	Tyrosin

1 Einleitung

1.1 *Klinische Bedeutung von Übelkeit und Erbrechen*

Erbrechen ist ein Abwehr- und Schutzmechanismus des Körpers, der durch verschiedene Stimuli ausgelöst werden kann. Dazu zählen z.B. die orale Aufnahme von Giften oder verdorbener Nahrung, die Irritation des Gleichgewichtssinns und Schwangerschaft. Erbrechen kann ebenso postoperativ als Nebenwirkung verschiedener Narkotika auftreten. Nicht zuletzt gehören Übelkeit und Erbrechen zu den unangenehmen Nebenwirkungen vieler Zytostatika- und Bestrahlungs-Therapien. Sie können zum Therapieabbruch durch die Patienten führen und damit den individuellen therapeutischen Erfolg beeinträchtigen [1].

Die Verbesserungen der Therapie von Tumorerkrankungen der letzten Jahre beruhen auf der Einführung neuer Zytostatika und veränderter Zytostatika-Kombinationen sowie auf höheren Dosierungen (Hochdosischemotherapie). Voraussetzung hierfür war unter anderem die Beherrschbarkeit der Nebenwirkungen - wie des Erbrechens - durch eine effiziente antiemetische Therapie. Das Zytostatika-induzierte Erbrechen ist durch effiziente Medikamente wie Serotonin-(5-HT₃)-Rezeptorantagonisten, NK₁-Rezeptorantagonisten und Glukokortikoide besser als früher beherrschbar, jedoch keineswegs überwunden.

1.2 *Pathophysiologie von Zytostatika-induzierter Übelkeit und Erbrechen*

Das Zytostatika-induzierte Erbrechen wird in das „akute“ und das „verzögerte“ Erbrechen eingeteilt. Das akute Erbrechen tritt innerhalb der ersten 24 Stunden nach Gabe der Zytostatika auf, während das verzögerte Erbrechen erst am zweiten Tag auftritt und bis zu 5 Tage anhalten kann. Erbricht ein Patient schon bei dem Gedanken an die Klinik oder bei bestimmten Gerüchen, die ihn an unangenehmes Erbrechen in vorangegangenen Behandlungszyklen erinnern, so leidet er an antizipatorischem Erbrechen. Antizipatorisches Erbrechen ist schwer behandelbar; darum gilt es, dieses durch optimale Therapie ab dem ersten Behandlungszyklus zu vermeiden [2].

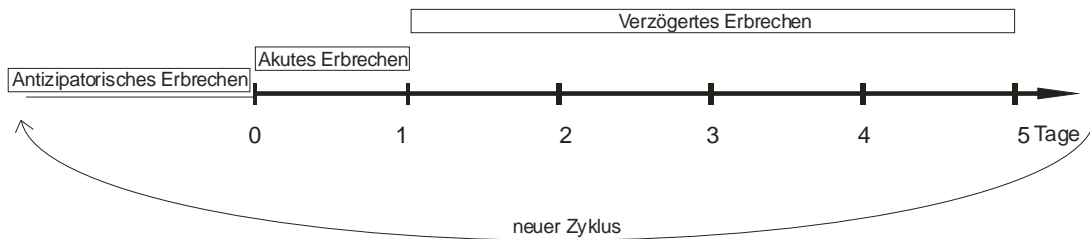


Abbildung 1: Formen des Erbrechens: In den ersten 24 h nach Gabe der zytostatischen Therapie spricht man von akutem Erbrechen, an den folgenden Tagen von verzögertem Erbrechen. Das antizipatorische Erbrechen kann vor den Folgezyklen der Zytostatika- oder Bestrahlungs-Therapie auftreten.

Akutes Erbrechen wird durch eine Zytostatika- oder Strahlentherapie-bedingte Freisetzung von Serotonin (Synonyme: 5-Hydroxytryptamin, 5-HT, 3-(2-Aminoethyl)-1H-indol-5-ol) aus den enterochromaffinen Zellen des Darmes ausgelöst [3] [Abbildung 2]. Tierexperimente zeigten, dass Bestrahlung und emetogene Zytostatika die Ausschüttung von Serotonin nicht direkt bewirken können [4].

Es werden zwei Mechanismen der Ausschüttung von Serotonin im Darm diskutiert:

- 1) Vermittlung der 5-HT-Ausschüttung durch Noradrenalin [5] oder Acetylcholin, das aus den enterischen Neuronen ausgeschüttet wird [6, 7]. Die Zugabe von Noradrenalin auf Zellen der Ratte zeigte nach Schäfermeyer et al. eine Steigerung der Serotoninkonzentration. Schwörer et al. hatten gefunden, dass isolierte enterochromaffine Zellen des Meerschweinchens nach Cisplatininduktion 5-HT ausschütteten und dies mit Acetylcholinausschüttung und der Stimulation von 5-HT₃-Rezeptoren einherging.
- 2) Vermittlung durch freie Radikale. Diese Theorie stammt aus einem Versuch, bei dem die Gabe von Pyrogallol, einem Donator für freie Radikale, in der Mäusspitzmaus zu Erbrechen führte, was sowohl durch die Gabe von Tropisetron als auch durch abdominale Vagotomie verhindert wurde [8].

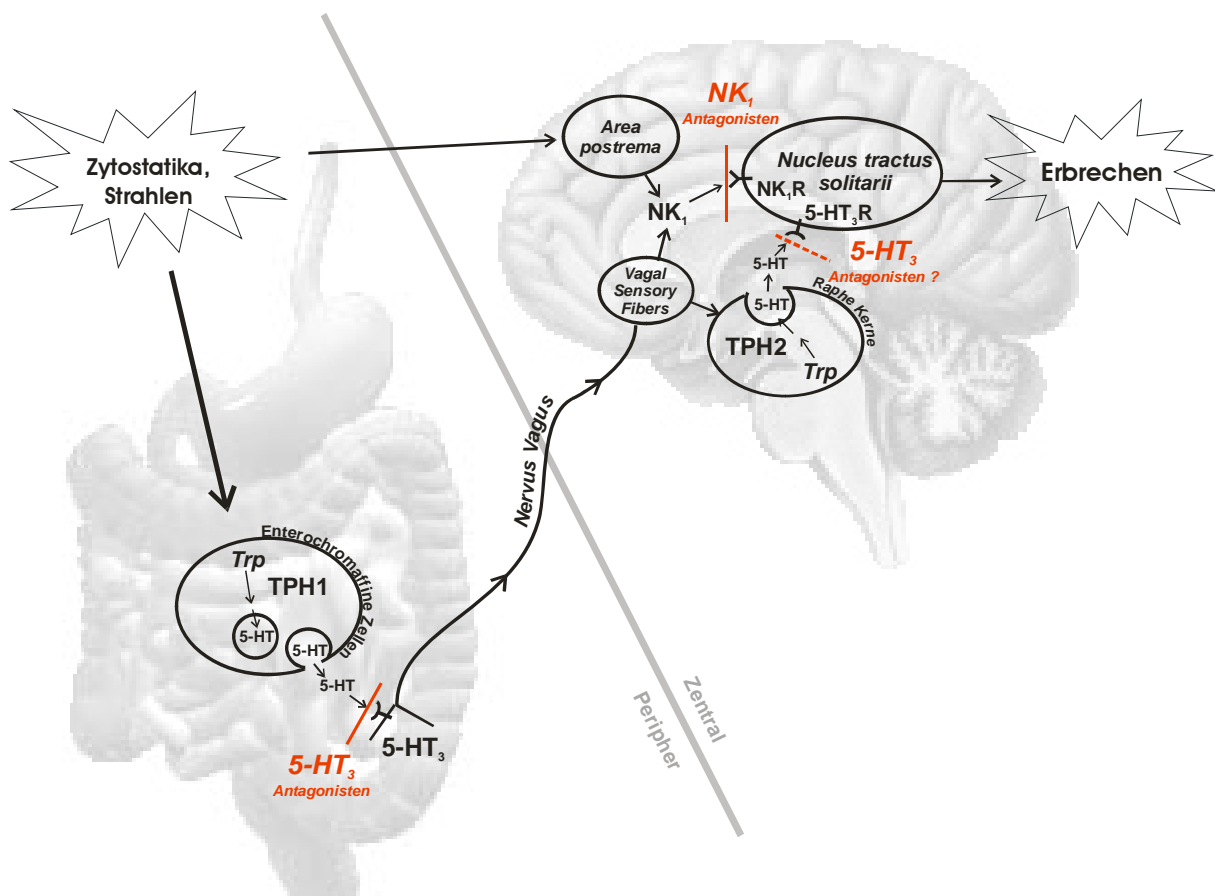


Abbildung 2: Schematische Darstellung der heute angenommenen Signalvermittlung des akuten Zytostatika-induzierten Erbrechens. Es werden die bekannten, durch Serotonin (5-HT) und Substanz P (NK_1) vermittelten Signalwege, die unter Zytostatikatherapie und Bestrahlung in der Peripherie (Darm) und im zentralen Nervensystem (Hirnstamm) aktiviert werden, gezeigt. Die Angriffspunkte der 5-HT₃- und NK_1 -Rezeptorantagonisten sind rot markiert. Die Tryptophanhydroxylase 1 und 2 (TPH1 und TPH2) ist als das geschwindigkeitsbestimmende Isoenzym bei der Serotoninsynthese aus Tryptophan (Trp) in die Signalübermittlung involviert.

Etwa 80% des gesamten Serotonins im Körper wird im Darm, wiederum 90% davon in den enterochromaffinen Zellen des Darmes synthetisiert [9]. Die Mehrzahl der heute verwendeten zytostatischen Arzneimittel aktivieren die Serotonin-Biosynthese im Dünndarm und verzögern vermutlich auch den Metabolismus des Serotonins [7]. Da 5-HT₃-Rezeptorantagonisten eine von der Serotoninkonzentration im Darm abhängige Freisetzung von 5-HT aus den enterochromaffinen Zellen zeigen, wird davon ausgegangen, dass 5-HT₃-Rezeptoren neben anderen 5-HT-Rezeptoren für die Hemmung der 5-HT-Ausschüttung an den EC-Zellen verantwortlich sind [6]. Dagegen spricht, dass Schäfermeyer et al. mit qRT-PCR weder die mRNA von HTR3 noch die von HTR4 in isolierten EC-Zellen nachweisen konnten [5]. Das ausgeschüttete Serotonin aktiviert über 5-HT₃-Rezeptoren auf den vagalen Afferenzen den *Nervus vagus*. Die Zellen des *Nervus vagus* enden im Hirnstamm. Dort

bewirkt das Signal des *Nervus vagus* die Ausschüttung von Serotonin aus den Raphe-Kernen [9]. Dieses Serotonin bewirkt über den *Nucleus tractus solitarii* die Auslösung von Erbrechen. Die elektrische Stimulation von abdominalen vagalen Nervenfasern im Tierversuch bewirkte einen 5-HT-Anstieg in der *Area postrema* und dem *Nucleus tractus solitarii* [7]. Eine direkte Wirkung der Zytostatika auf die *Area postrema* spielt nur eine untergeordnete Rolle. Die Häufigkeit des durch Cisplatin induzierten Erbrechens wurde durch Vagotomie und Sympathektomie im Tierversuch um 85% reduziert [4, 9]. Außerdem beschreibt Cubeddu et al., dass die Menge des Serotonin-Metaboliten 5-Hydroxyindolessigsäure mit der Erbrechenshäufigkeit innerhalb der ersten 24 h nach Chemotherapiegabe korrelierte [10]. Die Serotonin-Ausschüttung im Darm ist demnach der Hauptweg, über den das akute Zytostatika- und Strahlen-induzierte Erbrechen ausgelöst wird. Dafür spricht auch, dass nach Cisplatingabe keine Erhöhung der Serotoninkonzentration im Plasma und in Thrombozyten detektiert wurde [11].

Anders als beim akuten Erbrechen, bei dem die Hauptursache serotonerg ist, wird das verzögerte Erbrechen hauptsächlich über die Substanz P vermittelt. 5-HT₃-Rezeptorantagonisten haben hier kaum eine Wirkung. Die Ausschüttung von Substanz P wird auch durch das Signal des *Nervus vagus* vermittelt. Sie besetzt dann NK₁-Rezeptoren in Zellen im *Nucleus tractus solitarii* und löst so Erbrechen aus [9, 12, 13]. Es kann davon ausgegangen werden, dass die 5-HT₃-Rezeptorantagonisten möglicherweise hauptsächlich durch Blockade der Rezeptoren an den vagalen Afferenzen, also peripher im Dünndarm, antiemetisch wirken [9], während die NK₁-Rezeptorantagonisten ihre Hauptwirkung an den NK₁-Rezeptoren im Gehirn haben [14].

1.3 Pathophysiologie und Arzneitherapie gegen Erbrechen

Die Pathophysiologie, wie sie in Abschnitt 1.2 dargestellt ist, gilt nach heutigem Stand des Wissens nur für Zytostatika- und Strahlen-induziertes Erbrechen. So ist bekannt, dass See- und Reisekrankheit sowie Morbus Menière über Histamin (H₁)- und Muskarin-Rezeptoren im Brechzentrum den Vestibularapparat ansprechen und so Erbrechen auslösen. Des Weiteren wird Erbrechen durch Schmerz, Emotion und Geruch über das Limbische System ausgelöst. Toxine der Nahrung sowie Erreger der Gastroenteritis bewirken sowohl durch direkte Wirkung auf die Chemorezeptortriggerzone im Gehirn als auch über Chemorezeptoren der Darmwand Erbrechen [15]. Warum 70 – 80% aller schwangeren Frauen in der 4. -7. Schwangerschaftswoche unter Übelkeit und Erbrechen leiden, ist bisher nicht vollständig verstanden worden [16]. Die große Diskrepanz in der Pathophysiologie des Erbrechens

unterschiedlicher Genese wird auch bei der Betrachtung der entsprechenden Therapieempfehlungen deutlich. So wirken H₁-Antihistaminika nicht gegen Zytostatika-induziertes Erbrechen [17] und Dopamin- und Serotonin-Rezeptorantagonisten nicht bei Seekrankheit [18]. In Tabelle 1-1 werden die handelsüblichen Antiemetika mit ihren Indikationen aufgelistet.

Tabelle 1-1: Antiemetika und ihre Indikationen. Abkürzungen: H = Histamin, D = Dopamin, M = Muskarin, 5-HT = Serotonin [15] [19]

Antiemetika	Wirkstoffe	Indikationen
H ₁ -Rezeptorantagonisten	Dimenhydrinat, Promethazin	Schwangerschaftserbrechen Kinetosen
D ₂ -Rezeptorantagonisten	Haloperidol, Metoclopramid, Domperidon, Triflupromazin	Gastroenteritis, postoperatives Erbrechen
M-Rezeptorantagonisten	Scopolamin	Kinetosen
5-HT ₃ -Rezeptorantagonisten	Ondansetron, Granisetron,	Zytostatika-induziertes Erbrechen
Vitamin B6	Pyridoxin	Schwangerschaftserbrechen

1.4 Arzneitherapie von Zytostatika-induzierter Übelkeit und Erbrechen

Zytostatika werden je nach emetogenem Potential in hoch emetogene (z.B. Cisplatin, Dacarbazin, Cyclophosphamid > 1500 mg/m², die bei > 90% der Patienten zu Erbrechen führen), moderat emetogene (z.B. Cyclophosphamid < 1500 mg/m², Ifosamid, Doxorubicin, lösen bei 60 – 90% der Patienten Erbrechen aus), niedrig und minimal emetogene Substanzen (z.B. Etoposid, Fluorouracil, < 30% der Patienten erbrechen) unterteilt. Analog dazu wird Ganzkörperbestrahlung als hoch emetogen, Unterleibsbestrahlung als moderat emetogen und Bestrahlung kleinerer Körperregionen (Kopf, Becken, Extremitäten) als niedrig und minimal emetogen bezeichnet.

Nach der Leitlinie zur Therapie des Zytostatika-induzierten Erbrechens (www.onkosupport.de) sind 5-HT₃-Rezeptorantagonisten die wichtigste Substanzgruppe für die Therapie des akuten Zytostatika-induzierten Erbrechens. Es handelt sich um hoch selektive kompetitive Inhibitoren des 5-HT₃-Rezeptors [20]. Momentan befinden sich die in Tabelle 1-2 gezeigten 5-HT₃-Rezeptorantagonisten Granisetron, Ondansetron, Dolasetron, Tropisetron und seit kurzem auch Palonosetron (nur intravenös applizierbar) im Handel. Sie

werden in den angegebenen Dosierungen eingesetzt. Abhängig vom emetogenen Potential der gewählten zytostatischen Wirkstoffe wird für hoch emetogene Substanzen für den ersten Tag (akutes Erbrechen) eine Kombination aus Aprepitant (125 mg oral), einem 5-HT₃-Rezeptorantagonisten (Dosierung Tabelle 1-2) sowie Dexamethason (12 – 20 mg oral/iv) empfohlen. Für moderat emetogene Substanzen sollen 5-HT₃-Rezeptorantagonisten mit Dexamethason (8 mg oral/iv) kombiniert werden (www.onkosupport.de). Bei gering emetogenen Therapien reicht die Gabe von Dexamethason aus, um Erbrechen zu unterdrücken. Bei dem Wirkstoff Aprepitant handelt es sich um einen Substanz-P- bzw. Neurokinin-1-Rezeptorantagonisten. Substanz P ist an der Entstehung des akuten Erbrechens beteiligt [Abbildung 2] und maßgeblich für das verzögerte Erbrechen verantwortlich. Aprepitant wird als Add-on-Therapeutikum zur Standardtherapie mit Dexamethason und einem 5-HT₃-Rezeptorantagonisten auch bei akutem Erbrechen eingesetzt [21]. Mit der Einführung dieser Substanz konnte die antiemetische Therapie in den letzten Jahren noch weiter verbessert werden. Zur Kombination von Dexamethason mit 5-HT₃-Rezeptorantagonisten ist festzustellen, dass sie sich der Einzeltherapie mit 5-HT₃-Rezeptorantagonisten bei akutem Erbrechen als signifikant überlegen zeigte [22]. Auf welche Weise Dexamethason Erbrechen reduziert ist nicht bekannt; es hat jedoch anders als 5-HT₃-Rezeptorantagonisten nicht nur einen positiven Einfluss auf das akute, sondern auch auf das verzögerte Erbrechen (www.onkosupport.de). In schwer behandelbaren Fällen von Übelkeit und Erbrechen wird als weitere Substanz Delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) eingesetzt [23]. Das weniger potente Metoclopramid wird nur bei gering emetogenen Therapien eingesetzt. Neuroleptika wie Haloperidol oder Triflupromazin sind wegen der Nebenwirkungen heute nur Mittel der zweiten Wahl. Gleiches gilt für Benzodiazepine, die bei erregten Patienten zusätzlich sinnvoll sein können.

Tabelle 1-2: Äquivalenzdosen der erhältlichen 5-HT₃-Rezeptorantagonisten (www.onkosupport.de).

5-HT ₃ -Rezeptorantagonist	Dosierung oral (mg)	Dosierung intravenös (mg)
Ondansetron	16 – 24	8
Granisetron	2	1
Tropisetron	5	5
Dolasetron	100	100
Palonosetron	wird nicht oral verabreicht	0,25

Die antiemetische Therapie mit 5-HT₃-Rezeptorantagonisten wie Ondansetron oder Tropisetron in Kombination mit einem Glukokortikoid führt nur bei etwa 70% der Krebspatienten zu einer deutlichen Minderung von Übelkeit und Erbrechen in der Frühphase (akutes Erbrechen). Bei 30% der Patienten versagt die antiemetische Wirkung [3, 24].

In der erwähnten Konsens-Leitlinie werden klinisch relevante Unterschiede in der Effektivität der 5-HT₃-Rezeptorantagonisten (Setrone) ausdrücklich verneint. Dem widerspricht der Wissenschaftler Matti Aapro in seinem erst kürzlich publiziertem Review im Journal *Onkology* [25]. Aapro weist darauf hin, dass sich die Setrone im Hinblick auf ihre Halbwertszeit und ihre Metabolisierung erheblich unterscheiden und somit für einige Patienten die Auswahl des „richtigen“ Setrons von Bedeutung sein kann. Bei Krebspatienten kann die Halbwertszeit von 4 h (Ondansetron) bis 128 h (Palonosetron) divergieren. Metabolisiert werden alle 5-HT₃-Rezeptorantagonisten von Cytochrom P450 Isoenzymen. Es sind jedoch verschiedene Isoenzyme für die Metabolisierung der unterschiedlichen 5-HT₃-Rezeptorantagonisten verantwortlich.

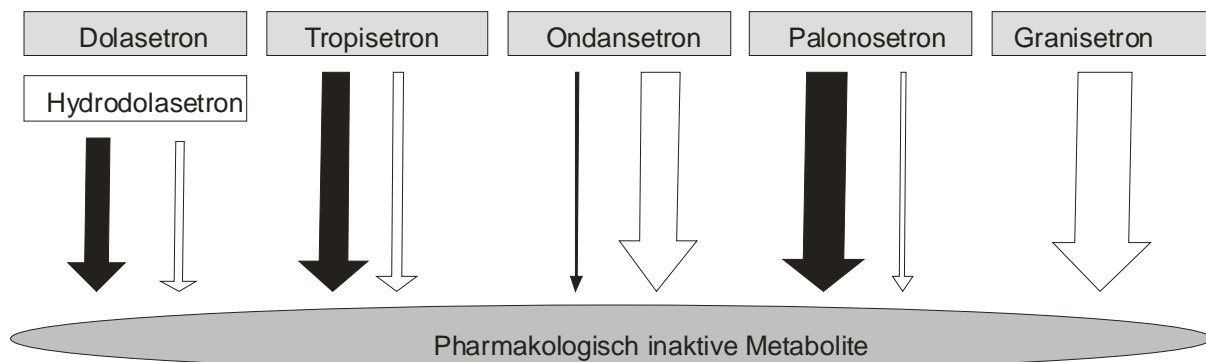


Abbildung 3: 5-HT₃-Rezeptorantagonisten werden über Cytochrom P450 Isoenzyme metabolisiert (durch Pfeile gekennzeichnet). Mit Ausnahme von Granisetron spielt das hoch polymorphe CYP2D6 eine wichtige Rolle in der Metabolisierung der Arzneistoffe (mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet). Die Metabolisierung über andere Cytochrom P450 Isoenzyme werden mit weißen Pfeilen gekennzeichnet. Sie stehen für CYP3A4, CYP1A2, CYP1A1 und CYP2E1. Granisetron ist der einzige 5-HT₃-Rezeptorantagonist, der ausschließlich über das CYP3A verstoffwechselt wird ([26] modifiziert).

Genetische Varianten, wie sie beispielsweise für CYP2D6 vorkommen, können einen erheblichen Einfluss auf die Wirkung, Wechselwirkung und Halbwertszeit des über dieses Enzym metabolisierten Arzneimittels haben [25]. Granisetron ist der einzige 5-HT₃-Rezeptorantagonist, der nicht unter Beteiligung des hochpolymorphen CYP2D6 metabolisiert wird [26]. Die unterschiedlich schnelle metabolische Inaktivierung einiger 5-HT₃-Rezeptorantagonisten durch Cytochrom-P450-2D6 erklärt 2% bis 5% der Therapieversager

unter der Therapie mit 5-HT₃-Rezeptorantagonisten in der kaukasischen Bevölkerung [24]. Für die verbleibenden 25% der Patienten, bei denen die Therapie versagt, sind möglicherweise genetische Variabilitäten in Rezeptoren die Ursache.

1.5 Serotonin und seine Serotoninrezeptoren

Serotonin ist ein biogenes Amin. Es wird aus der Aminosäure Tryptophan gebildet. Zuerst wird Tryptophan durch die geschwindigkeitsbestimmende Tryptophanhydroxylase 1 (TPH1) beziehungsweise im Gehirn durch die Tryptophanhydroxylase 2 (TPH2) [27] hydroxyliert und anschließend zu Serotonin decarboxyliert. Abgebaut wird es durch eine Monoaminoxidase und eine Aldehyddehydrogenase zu 5-Hydroxyindolessigsäure, die mit dem Urin ausgeschieden wird.

Serotonin ist ein wichtiger Neurotransmitter im menschlichen Körper. Seine Rezeptoren werden aufgrund struktureller Übereinstimmung und funktionellen Ähnlichkeiten in 7 verschiedene Klassen eingeteilt (5-HT₁ bis 5-HT₇). Mit Ausnahme des 5-HT₃-Rezeptors handelt es sich um G-Protein gekoppelte Rezeptoren [28]. Das sind Rezeptoren, die aus sieben Transmembranhelices bestehen, an die ein Guanyldiphosphat-(GDP)-bindendes-Protein (G-Protein) gekoppelt ist. Sobald Serotonin den Rezeptor besetzt, wird das G-Protein aktiviert. Das aktivierte G-Protein regt die Adenylatcyclase an, wodurch aus ATP cAMP gebildet wird. Die Folge der Aktivierung des Rezeptors ist also eine Erhöhung der cAMP-Konzentration [29].

Serotonin wirkt unter anderem auf den Tonus der glatten Muskulatur der Bronchien, des Darmes und des Uterus, es wirkt positiv inotrop und chronotrop am Herzen und hat einen Einfluss auf die Kontraktion der Blutgefäße [30]. Es wird mit vielen Krankheiten in Verbindung gebracht, darunter Depression, Schizophrenie, Migräne, Hypertonie, Essstörungen, Erbrechen und Reizdarmsyndrom [28]. Dieser Zusammenhang kann durch Ungleichgewicht in der Serotoninmenge oder durch Variationen in der Rezeptorbeschaffenheit erklärt werden.

1.6 Der Serotonin-3-Rezeptor

1.6.1 Aufbau des 5-HT₃-Rezeptors

Der Serotonin-3-Rezeptor (Synonyme: HTR₃ oder 5-HT₃-Rezeptor) ist als einziger Rezeptor der sieben bekannten Serotoninrezeptortypen (5-HT₁₋₇) ein Liganden-gesteuerter Ionenkanal. Er gehört durch seine Struktur der Superfamilie der Cystein-Schleifen-Liganden-gesteuerten Ionenkanäle an, zu der auch der nikotinische Acetylcholin-Rezeptor (nAChR), der GABA_A-Rezeptor und der Glycin-Rezeptor gehören. Ebenso wie andere Mitglieder dieser Rezeptorfamilie sind die 5-HT₃-Rezeptoren aus fünf unabhängigen Protein-Untereinheiten zusammengesetzt [31]. Für den 5-HT₃-Rezeptor sind mittlerweile fünf Gene bekannt, die für die Untereinheiten 5-HT_{3A-E} kodieren. Untersuchungen zur Funktionalität der Untereinheiten wurden bisher jedoch nur für HTR3A und HTR3B durchgeführt [32]. Je 5 Untereinheiten bilden eine Ionenpore, die sich nach Ligandenbindung öffnet und selektiv Kationen (Ca²⁺, Na⁺ und K⁺) durch die Pore hindurch lässt [Abbildung 4]. Als endogener Ligand fungiert das Serotonin.

Die Untereinheiten 5-HT_{3A-E} ähneln in ihrem Aufbau den Untereinheiten der anderen Rezeptoren der Cystein-Schleifen-Liganden-gesteuerten Ionenkanalfamilie. Jede der Untereinheiten besteht aus vier transmembranären Domänen, von denen jeweils die zweite transmembranäre Domäne das Innere der Ionenpore säumt und somit für den Ionentransport verantwortlich ist [33]. Die B-Untereinheit zeigt im Vergleich zu den anderen Untereinheiten wenige negative Ladungen in der zweiten transmembranären Domäne (M2), was vermutlich den Ionentransport beeinflusst. Als die nach der Ligandenbindung wichtigen Bereiche für die Signalübertragung zur Porenöffnung wurden die β 1- β 2-Schleife und die Cystein-Schleife (Cys-loop) im N-terminalen extrazellulären Bereich, die transmembranäre Domäne M2 selbst sowie die extrazelluläre Schleife zwischen M2 und M3 beschrieben [34]. In den 5-HT₃-Rezeptoruntereinheiten A und B, die in dieser Arbeit beachtet werden, sind alle für die Cys-Loop-Familie bekannten typischen Regionen enthalten - nicht zuletzt die beiden Cystein-Aminosäuren in der N-terminalen extrazellulären Region, deren Brückenbildung die Cystein-Schleife formt [32, 35]. Analog zu den nACh-Rezeptoren scheint die amphiphile Region zwischen M3 und M4, die auch als HA-Bereich (von *amphiphilic helix*) bekannt ist, für die Ionenleitfähigkeit des Rezeptors entscheidend zu sein [36]. Die Liganden-Bindungsstelle für Serotonin und Serotonin-Antagonisten befindet sich vor M1 in der N-terminalen Region [37] [33].

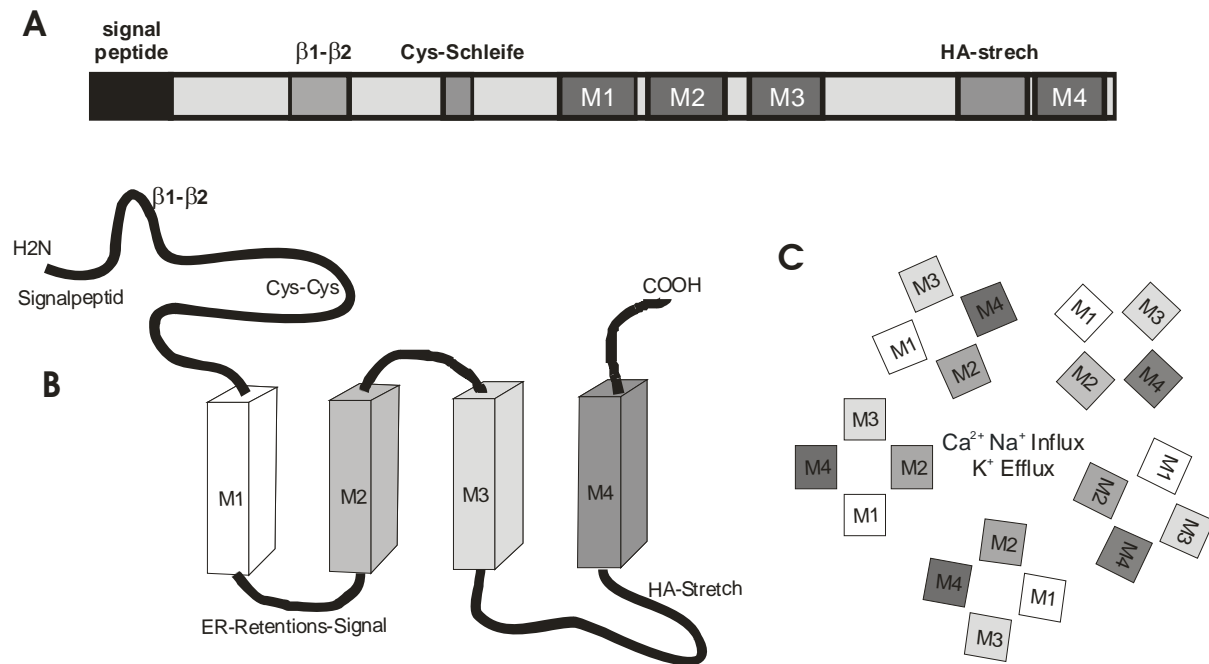


Abbildung 4: A) Struktur einer typischen 5-HT₃-Rezeptoruntereinheit. N-terminal liegt ein Signalpeptid und noch vor der transmembranären Domäne M1 befinden sich die β1-β2- und die Cystein-Schleifen-Strukturen. Zwischen der M3 und M4 liegt die amphiphile Region, die als HA-strech (amphiphile Helix) bezeichnet wird ([38] modifiziert). B) Sowohl das N- als auch das C-terminale Ende des Proteins befinden sich im extrazellulären Bereich. Der HA-Strech sowie das Signal zur Retention am Endoplasmatischen Retikulum befinden sich intrazellulär. C) Aufsicht auf den Ionenkanal. Der Rezeptor setzt sich aus 5 Untereinheiten zusammen, wobei die M2 Domäne das Innere der Ionenpore säumt. Nach Bindung des Liganden kommt es zur Öffnung der Pore und zum Ca²⁺- und Na⁺-Influx und K⁺-Efflux.

1.6.2 Untereinheiten A und B des 5-HT₃-Rezeptors

Die beide Gene, die für die 5-HT₃-Untereinheiten HTR3A und HTR3B kodieren, liegen auf Chromosom 11q23.1 in gleicher Orientierung direkt hintereinander [32, 35]. Die Gene kodieren für 478 (HTR3A) und 441 (HTR3B) Aminosäuren, die zu 44% identisch sind [32]. In der Region q27-28 des Chromosom 3 wurden drei weitere Gene HTR3C, HTR3D und HTR3E identifiziert [39, 40]. Experimentelle Untersuchungen zur Funktionalität und zur genetischen Variabilität dieser drei weiteren Untereinheiten sind bislang nicht bekannt.

Die genaue Komposition der Untereinheiten, die sich zu einem 5-HT₃-Rezeptor zusammensetzen, ist unbekannt. Es gibt Untersuchungen, die zeigen, dass von einer heteromeren Zusammensetzung des Rezeptors ausgegangen werden kann, da die elektrophysiologischen Eigenschaften eines aus A- und B-Untereinheiten heteromer zusammengesetzten Kanals gegenüber einem homomer aus A-Untereinheiten zusammengesetzten Kanal größere Ähnlichkeiten mit den physiologischen Eigenschaften des nativen Rezeptors aufwies. Die 5-HT_{3B}-Untereinheiten allein können keine funktionellen Rezeptoren bilden. [32, 35, 41]. Grund dafür könnte das sogenannte *Endoplasmatic Reticulum Retention Signal* in der

intrazellulären Schleife zwischen den transmembranären Domänen M1 und M2 von 5-HT_{3B} sein, das verhindert, dass homomere Rezeptoren aus B-Untereinheiten die Zellaußenmembran erreichen [42]. Gleichzeitige Expression von 5-HT_{3A} scheint die Außenmembranlokalisierung der 5-HT_{3B}-Untereinheiten möglich zu machen. Des Weiteren beobachteten Hapfelmeier et al., dass sich homomere A- von heteromeren A/B-Rezeptoren in ihrem Ansprechen auf verschiedene Agonisten und im Bezug auf ihre Resensitivierungszeit unterscheiden [41]. Auch wurde durch Kraftfeldmikroskopie von Zellen, die unterschiedlich markiert 5-HT_{3A} und 5-HT_{3B} heteromer exprimierten, eine 2A:3B-Zusammensetzung der 5-HT₃-Rezeptoren mit B-B-A-B-A Reihenfolge in Form einer pentamerischen Rosette gefunden [31]. In allen diesen Untersuchungen wurden jedoch immer nur die Untereinheiten A und B des 5-HT₃-Rezeptors betrachtet, so dass bisher keine Daten zu Untersuchungen mit allen 5 Untereinheiten verfügbar sind. In Geweben, die mehrere Untereinheiten exprimieren, wäre eine heteromere Zusammensetzung der Rezeptoren aus weiteren Untereinheiten jedoch theoretisch möglich.

1.6.3 Genregulation und gewebespezifische Expression der 5-HT_{3A}- und der 5-HT_{3B}-Untereinheit

Die 5-HT₃-Rezeptoren sind sowohl in peripheren Geweben als auch im zentralen Nervensystem exprimiert [43]. Es existieren bereits Untersuchungen zur Expression von 5-HT₃-Rezeptoruntereinheiten mittels RT-PCR, Northern-Blot oder *in situ*-Hybridisierung [32, 35, 39, 40].

Das Gen der HTR3B-Untereinheit wurde erstmals von Davies et al. im Januar 1999 in *Nature* beschrieben. Sie klonierten die cDNA aus einer fetalen Nieren-cDNA-Bibliothek (abgelegt in der NCBI-Datenbank unter AF080582). Festgestellt wurde eine hohe Expression im Gehirn, die durch Northern-Blot in den Gehirnregionen *Amygdala*, *Nucleus caudatus* und *Hippocampus* detektiert wurde. Peripher wurde HTR3B in der Niere detektiert [35]. Des Weiteren wurden bereits semiquantitative PCRs durchgeführt, die die HTR3A- und HTR3B-Genexpression untersuchten. Es wurde eindeutig die Expression von HTR3B im Gehirn und hier hauptsächlich in höheren Gehirnarealen nachgewiesen. In der *Medulla oblongata*, dem Ort der Induktion von Erbrechen, konnte HTR3B nicht detektiert werden. Wie die Autoren selbst schon anmerkten ist diese Methode der Detektion nicht sehr selektiv, denn sie detektierten im peripheren Gewebe nur in Testisgewebe HTR3B, nicht jedoch im Dünndarm, dem Gewebe von dem sie selbst HTR3B das erste Mal kloniert hatten (AF169255 aus einer auf ≥ 2 kb limitierten Dünndarm-cDNA-Bibliothek) [32]. Dubin et al. zeigte durch RT-PCR in

situ Hybridisierung die Expression von HTR3A und HTR3B zum Beispiel in den peripheren Geweben Dünn- und Dickdarm.

Es gibt bislang keine quantitativen Untersuchungen der HTR3A- und HTR3B-Expression in Geweben und keine Untersuchungen auf Proteinebene. Ursache dafür ist möglicherweise, dass kommerziell keine Antikörper für diese Proteine erworben werden können. Darüber hinaus fehlen bisher auch systematische Untersuchung der Struktur der 5'-Region des HTR3B-Gens und ihre transkriptionelle Regulation.

1.7 Bedeutung angeborener genetischer Variabilität in der Arzneitherapie

Die *Pharmakogenetik* ist ein Teilgebiet der Pharmakologie, das sich mit der Frage nach dem Einfluss von vererbten Besonderheiten auf pharmakologische Wirkungsunterschiede befasst [30]. Vererbte Besonderheiten sind zum Beispiel polymorphe einzelne Basen oder Bereiche im Genom, sogenannte Polymorphismen. Ein Polymorphismus unterscheidet sich von einer zufälligen Mutation nur in seiner Häufigkeit (mindestens 1%). Dabei ist zu beachten, dass die Häufigkeit eines Polymorphismus, in Abhängigkeit der betrachteten ethnischen Gruppe, oft stark variiert [44]. Im Genom des Menschen treten verschiedene genetische Variabilitäten auf. So können beispielsweise einzelne Nukleotide im Genom ausgetauscht sein (*Single Nucleotide Polymorphism* = SNP). Zudem gibt es polymorphe Stellen im Genom, an denen eine oder mehrere Basen fehlen oder hinzukommen. Diese Stellen werden als Deletionspolymorphismen (falls Basen fehlen) bzw. Insertionspolymorphismen (im Falle zusätzlich vorhandener Basen) bezeichnet. Außerdem findet man Deletionen von ganzen Genen und Genduplikationen. Die höchste Wahrscheinlichkeit Krankheitsentstehung, Arzneimittelmetabolismus und Arzneimittelwirkung zu beeinflussen, haben vor allem Deletionen oder Duplikationen von ganzen Genen und SNPs, die zu einem Aminosäureaustausch im Protein führen [45].

Als Beispiel für den Einfluss einer genetischen Variante auf die Kinetik von Arzneistoffen sei das Cytochrom P450 Isoenzym Cyp2D6 genannt. Bei Cyp2D6 führt eine Genduplikation zu extrem hoher Metabolisierungsrate von Substraten wie zum Beispiel den 5-HT₃-Rezeptorantagonisten Ondansetron und Tropisetron aber auch von Betablockern (z.B. Metoprolol) und Antidepressiva (z.B. Mirtazapin). Zusätzlich tritt bei diesem Enzym die Deletion des gesamten Gens auf, was zu einer verarmten Metabolisierungsrate und somit extrem hohen Arzneistoffkonzentrationen im Körper führen kann [46-48].

Die Pharmakodynamik wird zum Beispiel bei der Therapie von Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom stark beeinflusst. Bei der Therapie dieser Krankheit wird der Epidermale-Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) mit dem selektiven EGFR-Antagonisten Gefitinib blockiert. Bei ungefähr 10% aller Patienten spricht die Therapie nicht an, da diese Patienten genetische Varianten in der Tyrosinkinase-Domäne des EGFR aufweisen [44].

Genetische Variabilitäten können auch direkt mit Krankheiten korreliert werden. Beispielsweise erhöhen bestimmte Varianten auf Chromosom 10 die Wahrscheinlichkeit, im Alter an Makuladegeneration zu erkranken [49]. Als weiteres Beispiel sei ein Einzelnukleotid-Austausch an der Position -1019 von Cytosin nach Guanin im 5-HT_{1A}-Rezeptor genannt, der signifikant mit einem erhöhten Vorkommen von Depression und Selbstmord in Zusammenhang gebracht wird [50].

1.8 Genetische Variabilität im 5-HT₃-Rezeptor

Auch im 5-HT₃-Rezeptor könnten genetische Varianten die Häufigkeit von Erbrechen unter zytostatischer Therapie oder Bestrahlung beeinflussen bzw. könnte die Wirkung der Antiemetika verändern sein. Dafür wären unter Umständen Varianten in der kodierenden Sequenz verantwortlich, die die Form und die Funktionalität der Rezeptorproteine verändern. Ebenso in Betracht zu ziehen sind Varianten in den nichtkodierenden Introns, die zu verändertem Splicing führen. Möglicherweise liegt die Ursache aber auch in der Promotorregion beziehungsweise im 5'-nichttranslatierten Bereich des Gens. Varianten im Promotor - also vor dem Transkriptionsstart - haben einen Einfluss auf die Transkriptionsrate und somit auf die Proteinmenge während Varianten im 5'-nichttranslatierten Bereich hauptsächlich erst bei der Translation einen Einfluss auf die Proteinentstehung ausüben. Unterschiede in der Proteinmenge könnten schließlich zu einer veränderten Rezeptorzusammensetzung der 5-HT₃-Rezeptoren aus den fünf Untereinheiten führen.

Als Informationsquelle über schon bekannte Varianten in den 5-HT₃-Rezeptor-Untereinheiten dient die NCBI-Datenbank, in der genetische Varianten erfasst werden. Dort sind bisher im HTR3A-Gen einundachzig Genpolymorphismen ab dem Translationsstartpunkt und zehn in der 2 kb up-stream flankierenden Region aufgelistet. Für das HTR3B-Gen wurden einhunderzweiundzwanzig Polymorphismen ab Exon 1 eingetragen und acht wurden in der 2 kb *upstream* flankierenden Region verzeichnet (vgl. NCBI-Datenbank April 2006). Einige dieser Varianten wurden von unserer Arbeitsgruppe der Klinischen Pharmakologie am Universitätsklinikum Göttingen noch vor Erstellung vorliegender Dissertation detektiert und

fürten zum Eintrag in die Datenbank [51, 52]. Von besonderer Bedeutung für diese Arbeit ist der -100/-102-Deletionspolymorphismus (Lokalisation bezogen auf den Translationsstart als +1). Bei diesem Deletionspolymorphismus fehlen die Basen AAG. Die Allelhäufigkeit beträgt 12 – 14%. Bezüglich der Lage des Polymorphismus gab es bisher als Transkriptionsstarthinweise nur die beiden cDNA-Klone, die im Abschnitt 1.6.3 erwähnt sind. Bezogen auf die mRNA Sequenz AF169255 [32] liegt der Polymorphismus im 5'-nichttranslatierten Bereich, also auf der mRNA. Bezogen auf die Sequenz des Klons, der unter AF080582 in der Datenbank zu finden ist, liegt der Deletionspolymorphismus jedoch im Promotor des HTR3B-Gens. Der Frage nach der Lokalisation der Variante wird in dieser Arbeit ebenfalls nachgegangen.

Informationen über die genetische Nachbarschaft des Deletionspolymorphismus sind dank des weltweiten *Haplotype Mapping Projects* (HapMap) seit Ende 2005 allgemein verfügbar [53]. Dabei wurden in unterschiedlichen ethnischen Gruppen von gesunden Probanden tausende SNPs über das gesamte Genom genotypisiert. Diese Daten sind im Internet frei zugänglich und ermöglichen einen Einblick in die Verknüpfung (*linkage*) von Varianten untereinander. Es handelt sich um eine genormte Untersuchung von bekannten genetischen Varianten und basiert auf der Tatsache, dass Personen, die eine bestimmte Variante tragen, oft auch vorhersagbar weitere Varianten auf dem Allel an benachbarter Stelle aufweisen. Die Variantenverteilung ist also nicht dem Zufall überlassen; sie steht mit dem Zufall im „Ungleichgewicht“. Man spricht vom *linkage disequilibrium* (LD). Aus diesem Wissen lässt sich wiederum berechnen, in welcher Kombination die Varianten auf einem Allel mit hoher Wahrscheinlichkeit vorkommen. Diese möglichen Variantenkombinationen werden „Haplotypen“ genannt.

1.9 Medizinische Studien zum Einfluss von Varianten im HTR3A- und HTR3B-Gen

Untersuchungen zu HTR3A-Polymorphismen konnten keine klinische Relevanz im Bezug auf Zytostatika-induziertes Erbrechen zeigen [51]. Anders ist es bei den Polymorphismen im HTR3B-Gen. Hier konnte durch unsere Arbeitsgruppe in einer Studie an 242 Krebspatienten eine Assoziation der 100/-102 AAG Deletionsvariante (rs3831455) mit dem Auftreten von Zytostatika-induziertem Erbrechen gezeigt werden [52]. Wie jüngst publiziert wurde, war diese Variante ferner signifikant unterrepräsentiert bei Patienten mit bipolarer Depression [54]. Die Autoren letztgenannter Studie gehen davon aus, dass die Deletionsvariante auf der mRNA liegt und stellen die Hypothese einer möglicherweise durch die Variante veränderten

mRNA-Konformation auf. Die Funktionalität des -100/-102 AAG-Deletionspolymorphismus auf die HTR3B-Expression wurde im Rahmen dieser Dissertation erstmals untersucht.

1.10 Aufgabenstellung

Die zentrale Aufgabenstellung vorliegender Arbeit lag in der Untersuchung der -100/-102 AAG Deletionsvariante des HTR3B-Gens. Dafür wurden zunächst die Expressionsmuster von HTR3A und -B in verschiedenen Geweben analysiert und damit einer möglichen unterschiedlichen Zusammensetzung der 5-HT₃-Rezeptoren in Abhängigkeit von dem betrachteten Gewebe nachgegangen. Besondere Gewichtung lag auf der Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes in den für das Zytostatika-induzierte Erbrechen relevanten Geweben, wodurch zusätzliche Transkriptionsstartpunkte erstmals detektiert wurden. Anschließend wurden Abschnitte der gefundenen Promotorbereiche in Reporter-gen-Analysen betrachtet. Ziel war es Informationen zum Aufbau der Transkriptionsmaschinerie zu gewinnen. Zudem war die Frage zu beantworten, welchen Einfluss eine Auswahl von Hormonen und Arzneistoffen auf die Transkription haben. Des Weiteren wurde die Funktionalität der -100/-102 Deletionsvariante des HTR3B-Gens durch Reporter-genanalysen und *Electrophoretic-Mobility-Shift-Assays* (EMSA) näher erklärt. Zuletzt wurden mittels bioinformatischer Analysen die Varianten der HTR3B-Region auf ihre Verknüpfung mit anderen Varianten und mögliche Haplotypen untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien, Kits, Medien und Enzyme

Reagenzien, Kits, Medien und Enzyme	Lieferant/Hersteller
[α - ³² P]-dCTP	Amersham, Freiburg
1 kb Längenstandard für Agarosegel	Rapidozym, Berlin
100 bp Längenstandard für Agarosegel	Rapidozym, Berlin
17-alpha-Ethinylestradiol \geq 98%	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
2-Mercaptoethanol \geq 99%	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Acrylamidlösung wässrig 40% (w/v)	Biomol, Hamburg
Agar (für die Bakteriologie)	AppliChem, Darmstadt
Agarose Ultra Pure	Invitrogen, Karlsruhe
Ammonium Persulfat \geq 98%	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ammoniumsulfat \geq 99,5%	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ampicillin min. 99%	AppliChem, Darmstadt
BigDye® Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München
Borsäure 100%	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau Na-Salz (für die Elektrophorese)	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid \geq 99,5%	Merck, Darmstadt
<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i>	Fermentas, St. Leon-Roth
Chloramphenicol \geq 99%	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Chloroform \geq 99,8%	J.T. Baker, Phillipsburg, USA
Collagen A	Biochrom, Berlin
Dexamethason Pulver \geq 98%	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid \geq 99,5%	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat \geq 99,9%	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol \geq 99,5% (für die Molekularbiologie)	Appllichem, Darmstadt
DNeasy® Tissue Kit	Qiagen, Hilden
dNTP Set	ABgene, Epsom, UK
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega, Mannheim
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
EDTA 0,5M in wässriger Lösung	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
EDTA reinst.	Merck, Darmstadt
Ethanol 96%	J.T. Baker, Phillipsburg, USA
Ethidiumbromid 1% in H ₂ O (für die Elektrophorese)	Merck, Darmstadt
Expand Long Template PCR System	Roche Diagnostics, Mannheim
EZ1 DNA Blood Kit	Qiagen, Hilden
<i>Ficoll-Biocoil Separation Solution</i>	Biochrom, Berlin
Fötales Kälberserum	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
FuGENE 6 Transfektionsreagenz	Roche, Mannheim
Glycerin 85 %	Zentralapotheke, Klinikum Göttingen

Hefeextrakt	AppliChem, Darmstadt
Helipur® H plus N Desinfektionsmittel	Braun, Melsungen
HEPES 99,5%	Applichem, Darmstadt
Isoamylalkohol 98%	Schuchardt, Hohenbrunn
Isopropanol $\geq 99,9\%$	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat $\geq 99\%$	Riedel-De Haën AG, Seelze
Kaliumchlorid $\geq 99,5\%$	Riedel-De Haën AG, Seelze
Kaliumdihydrogenphosphat 100%	Merck, Darmstadt
Kanamycin $\geq 750\text{U/mg}$	AppliChem, Darmstadt
Klenow-Fragment	Fermentas, St. Leon-Roth
KOD HiFi DNA Polymerase	Novagen Merck, Darmstadt
Lipofectamine™2000	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Long Expand Polymerase</i>	Roche, Mannheim
Magnesiumchlorid $\geq 99\%$	Riedel-De Haën AG, Seelze
Magnesiumsulfat $\geq 99,5\%$	Merck, Darmstadt
Manganchlorid 99%	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
mCPBG $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
MOPS $\geq 99,5\%$ (für die Molekularbiologie)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumchlorid 100%	J.T. Baker, Phillipsburg, USA
Natriumhydroxid Plätzchen reinst.	Merck, Darmstadt
Neodisher® A 8, Reinigungspulver	Chem. Fabrik Dr. Weigert, Mühlenhagen
Nerven-Wachstumsfaktor-7S	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Pferdeserum	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Pfu-Polymerase	Promega, Mannheim
PicoGreen® <i>ds DNA quantification reagent</i>	Applied Biosystems, Darmstadt
Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
PMSF $\geq 98,5\%$	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Poly(dI-dC) x Poly(dI-dC)	Amersham, Freiburg
PureYield™ Midiprep Kit	Promega, Mannheim
qPCR® Core Kit	Eurogentec
qPCR® Core Kit for SYBR® Green	Eurogentec, Köln
Quick Ligation™ Kit	New England Biolabs, Beverly, USA
QuikChange® <i>Site-Directed Mutagenesis Kit</i>	Stratagene, Cedar Creek, USA
Random Hexanukleotid Primer	Roche, Mannheim
RLM RACE Kit	Ambion, Austin, USA
RNA 6000 Nano LabChip Kit	Agilent Technologies, Waldbronn
RNAguard Ribonuklease Inhibitor	Amersham, Freiburg
RNAse A ~70%	AppliChem, Darmstadt
RNAse Zap	Ambion, Austin, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Roti-Aqua® Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
RPMI Medium 1640	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Rubidiumchlorid (RbCl)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Sephadex™ G-50 Superfine	Amersham, Freiburg
<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>	BioRad, Hercules, USA

Super Script II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Taq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
TEMED $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TOPO® XL PCR Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Tris 100%	Roth, Karlsruhe
Tropisetron, Navoban®	Novartis Pharma, Nürnberg
TrypLE™ Express	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Trypton	AppliChem, Darmstadt
Xylencyanol FF (für die Molekularbiologie)	Applichem, Darmstadt

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Lieferant/Hersteller
50 ml Zentrifugenröhrchen	Beckman, München
96 Millipore MAHV N45 Platte	Millipore
96 Platten weiß für Lumineszenzmessungen	Greiner, Frickenhausen
96er PCR-Platten	ABgene, Epsom, UK
Adhesive PCR Foil Seals	ABgene, Epsom, UK
Blotting Paper/Whatman Paper	Schleicher & Schuell, Einbeck
Corning® Microtest 96-Well Platten	Corning, NY, USA
Dialysefilter VSWP01300	Millipore, Bedford, USA
Elektroporationsküvetten 2 mm	PreLab, Erlangen
Flat cap strips, 8er	ABgene, Epsom, UK
Glas Pasteur Pipetten 230 mm	WU, Mainz
Glashomogenisator Typ-B	Wheaton, Millville, USA
Hyperfilm™ ECL	Amersham, Buckinghamshire, UK
Kryo-Röhrchen	Nunc, Wiesbaden
Kulturflaschen 25 cm ² und 75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht
Kulturschalen 145 cm ² Oberfläche	Sarstedt, Hamburg
Küvetten (UVetten) 50-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Küvetten 10x4x45 mm	Sarstedt, Hamburg
Lochplatte für Sephadex	Millipore, Schwalbach
Mini Quick Spin Oligo Column	Roche, Mannheim
Minisart 2000 0,2 µm	Sartorius, Göttingen
Minisart NML 0,2 µm	Sartorius, Göttingen
Montage™ PCR Units	Millipore, Bedford, USA
Nunclo™ Multischalen 6, 12 und 24 Well	Nunc, Wiesbaden
Petrishalen	Sarstedt, Hamburg
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Hamburg
Pipettenspitzen Gel Saver II	Kisker, Steinfurt
Quali-Filterpipettenspitzen steril	Kisker, Steinfurt
Rahmen und Septen für Sequenzierung	Applied Biosystems, Darmstadt
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Sarstedt, Hamburg

Sterile Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Hamburg
Sterile Polypropylen-Röhrchen 15 ml	Greiner, Frickenhausen
Sterile Polypropylen-Röhrchen 50 ml	Sarstedt, Hamburg
TaqMan Adhesive Optical Covers	Applied Biosystems, Darmstadt
Thermo-Fast 384er Platten	ABgene Epsom, UK
Thermo-Fast 96er Platten	ABgene, Epsom, UK

2.1.3 Geräte

Geräte	Hersteller
3130xl Genetic Analyser	Applied Biosystems, Darmstadt
Bakterieninkubator-Incudrive	Schütt, Göttingen
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Bio-Photometer	Eppendorf, Hamburg
Biophotometer 6313	Eppendorf, Hamburg
BioRobot® EZ1	Qiagen, Hilden
Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
CO2-Inkubator Cellsafe	Integra Bioscience, Chur, CH
ComPhor Mtl Maxi Gel-Kammer	Biozym, Hessisch Oldendorf
Desatronic 3000/200 Powersupply	Desaga, Heidelberg
DRYgelSR SE1160	Hoefer, San Francisco, USA
Elektroporator Gene Pulser II	BioRad, Hercules USA
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Fluor-S™ Multilimager	BioRad, Hercules, USA
Fujifilm BAS-1500 reader	Raytest Isotopenmessgeräte, Straubenhardt
Gelkammer Ruby SE600	Hoefer, San Francisco, USA
GloMax	Turner BioSystems, Sunnyvale, USA
Laborfuge 400R	Heraeus, Hanau
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Microskop Axiovert 40 CFL	Zeiss, Jena
MS 2 Minishaker-Vortexer	IKA, Staufen
PTC-200 Peltier Thermal Gradient Cycler	MJ Research/BioRad, Hercules, USA
Schüttler für Bakterien K2 260 basic	IKA, Staufen
Sterilbank-Clean Air type DFL/REC4 KL2A	Mahl, Trendelburg
Szintillationsmessgerät Ls5000TD	Beckman Instruments, Fullerton, USA
TaqMan 7900HT	Applied Biosystems, Darmstadt
Tecan Ultra Mikropלטtengerät	Tecan, Crailsheim
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
ThermoStat plus	Eppendorf, Hamburg
Vertikal-Autoklav KSG 40/60	KSG, Olching
Vertikal-Autoklav: FV für Sterilgut	Tecnorama, Fernwald
Wasserbad GFL 1083	Schütt, Göttingen
Zentrifuge Isotopenlabor: Biofuge 15 R	Heraeus, Hanau

Zentrifuge JA-20 Rotor

Beckman, München

2.1.4 Software, Datenbanken und Sequenzen

Software, Datenbanken und Sequenzen	Hersteller
3100 Data Collection Software	Applied Biosystems
Adobe Photoshop	Adobe Systems GmbH, München
Clon Manager Suite	SECentral
DNA Sequencing Analysis	Applied Biosystems
gDNA-Sequenz (Ratte) GI62654011	NCBI, Bethesda, USA
gDNA-Sequenz GI:51511727	NCBI, Bethesda, USA
Haploview	www.broad.mit.edu [55]
mRNA-Sequenz AF 169255 und AF080582	NCBI, Bethesda, USA
MS Office	Microsoft, USA
National Center for Biotechnology Information	NCBI, Bethesda, USA
Primer Express	Applied Biosystems
Quantity One S	Bio-Rad, München
SPSS	SPSS Inc., Chicago, USA
Staden Package	SourceForge.net
Taqmananalyse-Software SDS	Applied Biosystems
Tess-Datenbank	University of Pennsylvania, Pennsylvania, USA
TRANSFAC-Datenbank	BIOBASE, Göttingen
XFluor4 Software	Tecan, Crailsheim

2.1.5 Biologisches Material

2.1.5.1 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Charakteristika	Bezug von:	Ref.
CaCo-2	Mensch	Kolon Adenokarzinomzelle, wachsen als Epithelzellen, Ähnlichkeit mit Dünndarmzellen	DMSZ, Braunschweig	[56, 57]
HEK 293	Human	Embryonale Nierenzelllinie immortalisiert mit <i>human adenovirus type 5</i> DNA	DMSZ Braunschweig	[58]
Lan-1	Human	Neuroblastom-Zellen	Prof. Schweigerer und Dr. Becker, Uni-Göttingen Pädiatrie	[59]
PC-12	Ratte	Adrenale Pheochromozytom-Zelllinie	DMSZ, Braunschweig	[60]
SH-EP, SK-N-AS, SK-N-SH, SMS-Kan, SH-SY5Y, CHLA 20, CHLA 90, Lan 2, Lan 5, Lan 6, CHP100,	Human	Neuroblastom-Zellen	Prof. Schweigerer und Dr. Becker, Uni-Göttingen Pädiatrie	

CHP 134, Kelly, IMR 5,
IMR32, Gi-men, KCN,
NB 69, NGP, NLF, NMB

HL60	Human	Akute myeloische Leukämie	DMSZ Braunschweig
Colo320	Human	Colon-Adenokarzinom	Prof. Schwörer, Gastroenterologie Uni-Göttingen
Hela	Human	Cervix-Karzinom	ATCC, Wesel

2.1.5.2 Bakterienstämme

Stamm		Verwendung für Transfektion	Bezug/Referenz
Top10	Escherichia coli	Elektro-kompetent	Invitrogen, Karlsruhe
XL1-Blue	Escherichia coli	Chemisch-kompetent	[61]

2.1.5.3 Vektoren

Vektoren	Verwendung	Restistenz	Bezug/Referenz
IRAU _{p969C022D6}	Referenzvektor (HTR3A)	Choramphenicol	RZPD, Berlin
pCR®-XL-TOPO	Zwischenklonierung	Kanamycin	Invitrogen, Karlsruhe
pGL3_Promotor	Luciferasereporter-Gen-Plasmid mit SV40 Promotor	Ampicillin	Promega, Mannheim
pXP2	Luciferasereporter-Gen-Plasmid ohne eigenen Promotor	Ampicillin	Molekulare Pharmakologie Prof. W. Knepel, [62]

2.1.5.4 RNA-Präparate

Klone	Bestellnummer	Bezug/Referenz
Human Amygdala total RNA	#6868	Ambion, Cambridgeshire, UK
Human Hypothalamus total RNA	#6864	Ambion, Cambridgeshire, UK
Human Caudate Nucleus brain total RNA	#6768	Ambion, Cambridgeshire, UK
Human Hippocampus total RNA	#6870	Ambion, Cambridgeshire, UK
Human Pons brain total RNA	#6824	Ambion, Cambridgeshire, UK
Human Medulla Brain total RNA	#6822	Ambion, Cambridgeshire, UK
Human Brain Total RNA	64098-1	Clontech, Palo Alto, USA
Human Small Intestine total RNA	64105-1	Clontech, Palo Alto, USA
Human Colon Total RNA	64112-1	Clontech, Palo Alto, USA

2.1.5.5 Oligonukleotide (Hersteller: IBA, Göttingen/MWG-Biotech, Ebersberg)

Primer	5' – 3' Sequenz
E1a_f	CAA GTG TAA TGG CTC CCC TGT G
E1a_r	GGC CTT GGT CCA GTT GTA AAC A
E1b_f	AAA GAA ACC AAG CTC CTC TTA
E1b_r	TTG ATT CTC TGC ATC CAC ATC C
E2/3_f	TAG CCA CAG ATA CAC ATC ATC C
Genspez_HTR3B_revtrans	GAG ACA GGG TCT TGT TCT GTC ACC
HT_3B_4inframe	CCC GGG ACA GGG GAG CCA TTA CAC TTG
HT3b_1kb_F	TAG CCC GGG ACC TCC AAA ACC AAG TCA ACA
HT3b_2kb_F	TAG CCC GGG GTG CTT GTG TCT CTT TAG TCT GAT
HTR3B_500_f	GGT TTC CAT TAA GCT TGT GTA ATT CAA GAG
HTR3B_500_r	TAC CGG AAT GCC AAG CTC AGA
HTR3B_cDNA_ORF_r	GGT CTA GAC CTC CCA AAG CAC TGG GAC TAT AG
HTR3B_P2_f2	GGT GCA TGG GAG AGT AAG TCA TTA A
HTR3B_P2_r2	TCC CTG CCA GTT CAA CTA CAA TCT C
HTR3B_Prom2_F	TAA TCC CGG GCC TGT AAT TGA TCT TTC TCC TCA GGC
HTR3B_Prom2_R	TAG GCC CGG GCA AGA TGG TCC TTA CCA CAT CCA
HTR3B_res_f	AGA GGG GAA TTT GAG TCT TTG T
HTR3B_res_r	TTA ACG AGA GCC CAA TTT GTA C
LUCP_FLUpXP2_rev	CCA TTT TAC CAA CAG TAC CG
PCR_3'_f	CAC GCC CAG CTT ATT TGC AA
PCR_3'_r	AAT GGA AAC CGT GGT ATT GTC TAA TGA AGA AC
PCR_3'verk_f	CAC GCC CAG CTT ATT TGC AA
PCR_3'verk_r	AAT GGA AAC CGT GGT ATT GTC TAA TGA AGA AC
QuickChange_Del_F	CAT CAA CTG GCA AAC GGA GGA GAA CAG AGT G
QuickChange_Del_R	CAT TCT GTT CTC CTC CTC CGT TTG CCA GTT GAT G
Seq_5HT3b_1000rev	GTT GGT GAA GGG AGT GGT ATA CAC A
Seq_5HT3B_1460_rev	AGG ATG CTT CTA GGC TTA TTG AAG ATG A
Seq_5HT3b_2000rev	GCT GTG ATT GTG CCA CTG CAC T
Seq_HT3b_1433ff_F	TCA TCT TCA ATA AGC CTA GAA GCA TCC T
Seq_HT3b_300bp_F	TAG CCC GGG AGG GGC TCC TCT TAG ATT ACA
Seq_HT3b_344ff_F	GGA TTA CAG GTA TGA GCC ATT GCA CCT
Seq_HT3b_756ff_F	CCG AGT AGC TGG GAT TAC AGG CAT GT
Tandem_del_as2	CCG TTT GCC AGT TCA CTC TGT TCT CCT CCT CCG TTT GC
Tandem_del_as2_BglII	GAT CTC GAC ACT CTG TTC TCC TCC TCC GTT TGC CAG TTC ACT CTG TTC TCC TCC T
Tandem_del_s1	CAA CTG GCA AAC GGA GGA GGA GAA CAG AGT GAA CTG GCA AAC GGA GGA
Tandem_del_s2_BglII	GGA GAA CAG AGT GAA CTG GCA AAC GGA GGA GGA GAA CAG AGT GTC GA
Tandem_ins_as1	CAT GGT TGA CCG TTT GCC TCT TCC TCC TCT TGT CTC ACT TGA CCG TTT GCC TCT TC
Tandem_ins_as2_BglII	GAT CTC GAC ACT CTG TTC TCC TCC TTC TCC GTT TGC CAG TTC ACT CTG

	TTC TCC TC
Tandem_ins_s1	CAA CTG GCA AAC GGA GAA GGA GGA GAA CAG AGT GAA CTG GCA AAC GGA GAA GGA GG
Tandem_ins_s2_BglII	AGA ACA GAG TGA ACT GGC AAA CGG AGA AGG AGG AGA ACA GAG TGT CGA

2.1.5.6 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	Hersteller
BfrB I	New England Biolabs, Beverly, USA
Bgl I	Fermentas, St. Leon-Roth
EcoR I	Fermentas, St. Leon-Roth
Hind III	Fermentas, St. Leon-Roth
Pst I	Fermentas, St. Leon-Roth
Xma I	New England Biolabs, Beverly, USA

2.1.5.7 DNA

Es wurde genomische DNA verwendet, die für die Studie von Trembley und Kaiser [52] aus Blut von Probanden gewonnen worden war.

2.2 Methoden

2.2.1 Sterilität

Alle verwendeten Pipettenspitzen, 1.5 ml und 2 ml Reaktionsgefäße sowie das destillierte Wasser wurden vor Gebrauch autoklaviert. Dies geschah durch Dampfsterilisation im Vertikal-Autoklav FV, Tecnorama bei 120°C unter Druck für 20 Minuten. Glasgeräte und Lösungen, für deren Einsatz Sterilität erforderlich waren wurden ebenso autoklaviert. Handelte es sich um Flüssigkeiten, die nicht autoklavierbar waren (z.B. HEPES/KOH-Lösung), so wurden diese Substanzen durch Filter der Porengröße 0,2 µm filtriert.

2.2.2 Entsorgung von biologischem Material der Sicherheitsstufe S1

Zellüberstände von gentechnisch bearbeiteten Zellen wurden mit Helipur®-Lösung gemischt und Bakterienlösungen mit Neodisher® abgetötet. Alle für die Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen verwendeten Einwegartikel und -gefäße wurden im KSG-Autoklav bei 120°C unter Druck für mindestens 20 Minuten autoklaviert.

2.2.3 DNA Standardmethoden

2.2.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCR-Reaktionen dienen der *in vitro* Amplifikation von DNA-Abschnitten. Folgende Vorgänge werden dabei zyklisch wiederholt: Denaturierung, Primeranlagerung und Kettenverlängerung. Bei der Denaturierung werden die DNA-Doppelstränge voneinander getrennt. Im Schritte der Primeranlagerung lagern sich beim Abkühlen des Ansatzes kurze einzelsträngige DNA-Stücke (Primer) komplementär an die Matrizen-DNA an. Im folgenden Elongationsschritt der PCR werden die Primer durch die Taq-Polymerase in 3'-Richtung komplementär zur DNA-Matrize verlängert. Die Elongationszeit ist abhängig von der Länge des amplifizierten Abschnittes. Pro Kilobase Transkript wurde ca. eine Minute Elongationszeit gewährt. Die drei Phasen der PCR wurden 25- bis 40-fach wiederholt. Allen PCR-Reaktionen wurde ein finaler Elongationsschritt für 5 bis 10 Minuten bei 72°C angehängt, um alle begonnenen Elongationen zu vervollständigen.

Die Primer-Generierung wurde mit dem Programm „Primer Express“ der Firma Applied Biosystems durchgeführt. In Fällen, in denen eine besonders niedrige Fehlerrate in der PCR notwendig war, wurden die Polymerasen *KOD-HiFi-DNA-Polymerase* (Novagen) und *Long-Expand Polymerase* (Roche) verwendet. Wenn darauf eine TOPO-Klonierung des PCR-Produktes folgte, wurde das PCR-Produkt 10 Minuten lang mit dNTPs, Puffer und Taq-Polymerase bei 72°C behandelt, um A-Überhänge zu generieren. Bei der Verwendung von *Hot Start* Taq-Polymerase wie sie im Mastermix für Genexpressionsmessung [Abschnitt 2.2.12] enthalten ist, wurde vor der PCR ein Aktivierungsschritt von 95°C über 10 Minuten durchgeführt.

Standardansatz für PCRs

dNTPs (10 mM)	0,4 µl
Vorwärts-Primer (100 µM)	0,1 µl
Rückwärts-Primer (100 µM)	0,1 µl
Taq-Polymerase (Qiagen)	0,2 µl
10 x Puffer Qiagen	2,0 µl
DNA	100-500 ng
ddH ₂ O	ad 20 µl µl

Standard-PCR-Bedingungen

Stufe	Temperatur	Zeit	
Denaturierung	95 °C	2 - 10 min	
Denaturierung	96 °C	30 s	
Anlagerung	50 – 70 °C	30 s	Zyklische Wiederholung 25-40 x
Elongation	72 °C	1 min/kb	
Finale Elongation	72 °C	5 - 10 min	
Kühlung	8 °C		

Die Methode der PCR fand z.B. als Kolonie-PCR [2.2.9.10], Sequenzierungs-PCR [2.2.5], bei der Genexpressions-PCR [2.2.12.5], in der Methode des 5'RACE [2.2.6] sowie zum Einführen von Varianten in Plasmide [2.2.7] Verwendung. Alle verwendeten Primer wurden in einer Tabelle aufgelistet. [2.1.5.5].

2.2.3.2 DNA Isolation

2.2.3.2.1 Plasmid isolation

Die Isolation von Plasmiden wurde in unterschiedlichen Volumina durchgeführt. Die Präparation von Plasmid-DNA in einem Volumen von maximal 5 ml diente analytischen Zwecken (Restriktionsverdau, Sequenzierung und zur Umklonierung von Fragmenten in andere Vektoren). Die Methode der Midipräparation liefert reinere DNA und eine höhere Ausbeute. Diese wurde mit 100 ml Kulturvolumen durchgeführt. Die so gewonnene Plasmid-DNA diente zur Transfektion [2.2.10.5] von eukaryotischen Zellen.

2.2.3.2.1.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

Unter Minipräparation sind Plasmidisolationen aus 1-5 ml Bakterienkultur zusammengefasst.

Verwendete Puffer:

Resuspensionspuffer (Puffer 1) pH 8,0

Lagerung bei -4°C	Tris-HCl	50 mM
	EDTA	10 mM
	RNAse A ¹	100 µg/ml

¹ Die RNAse A wurde nach der Autoklavierung des Puffers zugesetzt.

Lysepuffer (Puffer 2)

Lagerung bei Raumtemperatur	NaOH	200 mM
	SDS	1 % (w/v)

Neutralisationspuffer (Puffer 3) pH 5,5

Lagerung bei Raumtemperatur	Kaliumacetat	3 M
-----------------------------	--------------	-----

Zur Herstellung der Bakterienkultur wurden 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion versetzt, anschließend mit einer Kolonie von der Agarplatte versetzt und über Nacht kultiviert [2.2.9.2]. Die Minikultur wurde am folgenden Tag für 10 Minuten bei 3220 x g und 4°C zentrifugiert. Die Präparation konnte bei Bedarf an dieser Stelle unterbrochen werden, indem das Pellet bei -20°C eingefroren wurde. Zur weiteren Präparation wurde das Pellet in 250 µl RNase A enthaltendem Resuspensionspuffer aufgenommen, dann 5 Minuten mit 250 µl alkalischem Lysepuffer und anschließend für 5 min mit 300 µl schwach saurem Neutralisationspuffer inkubiert. Das Proteinpräzipitat wurde 30 min bei 16060 x g und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Er wurde mit 500 µl einer 24:1 Mischung aus Chloroform und Isoamylalkohol ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde durch Zentrifugation bei Raumtemperatur für 5 Minuten bei 16060 x g abgetrennt. In der oberen polaren Phase befand sich die Plasmid-DNA. Dieser Überstand wurde mit 0,7 Volumenanteilen Isopropanol (600 µl) versetzt und nach sorgfältigem Mischen 30 min bei 4°C und 16060 x g zentrifugiert. Das erhaltene DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, für 5 min bei 4°C und 16060 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in offenen Reaktionsgefäßen bei 37°C - zum Schutz mit Papier abgedeckt - getrocknet und in 50 µl autoklaviertem Aqua bidest. aufgenommen. Wenn eine hohe Reinheit der Plasmid-DNA im folgenden nicht zwingend erforderlich war, wurde vom Ausschütteln mit Chloroform/Isoamylalkohol abgesehen.

2.2.3.2.1.2 Plasmidisolation von 100 ml Bakterienkultur (Midiprep)

Für die Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen wurde das Plasmid mit dem PureYield™ Midiprep Kit gemäß dem mitgelieferten Protokoll präpariert. Dazu wurden 100 ml über Nacht (in 500 ml Glasflaschen/geschüttelt) gewachsene Bakterienkultur [2.2.9.2] durch Zentrifugation für 20 min bei 4°C und 3220 x g sedimentiert und mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen. Zelltrümmer, Proteine und Salzkomplexe wurden nach der Neutralisation durch Zentrifugation bei 15 000 x g in der Beckmanzentrifuge bei Raumtemperatur abgetrennt. Der Überstand wurde auf die Säulen des Kits gegeben und die

DNA durch Anlegen von Vakuum an die Säule gebunden. Im ersten Waschschrift wurden bakterielle Endotoxine entfernt und anschließend die DNA mit Puffer gewaschen. Die gereinigte DNA wurde mit heißem Nuklease-freiem Wasser in einem letzten Zentrifugationsschritt bei 2 000 x g und Raumtemperatur eluiert. Die Quantifizierung der Plasmide erfolgte wie unter [2.2.3.4] beschrieben.

2.2.3.2.2 DNA-Isolation aus Blut

Die DNA-Isolation aus Blut wurde mit dem EZ1 DNA Blood Kit, Qiagen unter Verwendung des BioRobot® EZ1, Qiagen nach Anweisung des Herstellers durchgeführt.

2.2.3.2.3 DNA-Isolation aus Gewebekultur

Die Isolation von DNA aus Zellkulturgewebe erfolgte mit dem DNeasy® Tissue Kit, Qiagen nach Angaben des Herstellers. Eingesetzt wurde die Zellmenge einer halben 75 cm² Gewebekulturflasche.

2.2.3.3 Lagerung von DNA

Wenn DNA länger als 2 Tage gelagert wurde, geschah dies bei -20°C, um einem Pilz- oder Bakterienwachstum bzw. um DNase Spaltungen vorzubeugen.

2.2.3.4 DNA Quantifizierung

2.2.3.4.1 Photometrische Quantifizierung

Die DNA Konzentration wurde mittels Absorption von UV-Licht in ihrem Absorptionsmaximum bei 260 nm quantifiziert. Eine Extinktion bei 260 nm (E_{260}) von 1 entspricht der Konzentration von 50 µg/ml DNA. Informationen über die Reinheit der vermessenen DNA wurden mit dem Quotienten aus E_{260}/E_{280} ermittelt. Quotienten, die höher waren als 1,5, indizierten einen hohen Reinheitsgrad der DNA Probe. Zur Messung wurden die Proben 1 : 1 000 oder 2 : 58 in TE-Puffer verdünnt und der Leerwert mit TE-Puffer eingestellt. Verwendung fanden UV-durchlässige Küvetten: UVetten 50-1000 µl oder Sarstedt Küvetten 10 x 4 x 45 mm. Die Messungen wurden im Biophotometer 6313 durchgeführt.

TE-Puffer, pH 7,5

Tris	10 mM
EDTA	1 mM

2.2.3.4.2 Quantifizierung durch Interkalation

Bei dieser Methode wurde die Fähigkeit des fluoreszierenden Farbstoffes PicoGreen®, in doppelsträngige DNA zu interkalieren, genutzt, um DNA zu quantifizieren. Die Messungen bei 485 nm Wellenlänge und 535 nm Wellenlänge fanden auf Platten im 96er Format im TecanUltra-Mikroplattengerät statt. Durch die hohe Empfindlichkeit von 50 pg/µl und die Möglichkeit, 96 Proben gleichzeitig zu vermessen, hat diese Methode große Vorteile gegenüber der photometrischen Einzelbestimmung [2.2.3.4.1]. Die DNA wurde auf Konzentrationen von über 50 pg/µl und maximal 20 ng/µl verdünnt. Es wurden davon 5 µl eingesetzt (entsprechend 250 pg bis 100 ng). Das PicoGreen® Reagenz wurde 400-fach mit TE-Puffer pH 8,0 verdünnt mit je 200 µl auf die Corning® Microtest 96-Well Platten (schwarz mit durchsichtigem Boden) verteilt. Als DNA-Standard-Lösung wurde für alle durchgeführten Quantifizierungen einmalig genomische DNA von fünf Probanden vereinigt und mittels photometrischer Gehaltsbestimmung 2.2.3.4.1 quantifiziert und anschließend verdünnt. Nach Zugabe dieser DNA-Standard-Lösung der Konzentration 10 ng/µl (0, 3, 5, 7, 9, 11 µl) und der verdünnten DNA Proben (für PureYield Midi Prep extrahierte Plasmide hatte sich eine 1 : 20 Verdünnung bewährt) wurde die Platte mit lichtdichter Folie verschlossen und bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubiert, um die Interkalation des Farbstoffes in die DNA zu gewährleisten. Anschließend wurde die Fluoreszenz bei 485 nm Extinktion und 535 nm Emission im TecanUltra Mikroplatten Messgerät vermessen und mit der XFluor4 Software ausgewertet. Alle Proben wurden wenigstens 2-fach gemessen.

2.2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese nutzt man die negative Ladung von Nukleinsäuren. Nach Anlegen des elektrischen Feldes wandern die DNA-Moleküle zum positiven Pol. Kleinere Moleküle wandern im elektrischen Feld schneller durch das Agarosegitter als DNA-Moleküle mit höherem Molekulargewicht, dadurch werden die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe im Gel aufgetrennt. Es wurden Agarosegele in Konzentrationen von 0,8 – 2,5% hergestellt. Alle Gele und der Laufpuffer enthielten 0,5 µg Ethidiumbromid pro ml Gel, welches durch Interkalation in die DNA-Doppelstränge die DNA-Banden unter UV-Licht detektierbar machte. Nach Zugabe des Probenpuffers wurden die Proben in die Taschen des Gels pipettiert. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurden Längenstandards auf jedes Gel zusätzlich aufgetragen (100 bp und 1 kb Längenstandard, Rapidozym). Die Elektrophorese fand in ComPhor Mtl Maxi-Gelkammern bei 120 V statt. Das Gel, bestehend aus TBE-Puffer mit der entsprechenden Menge Agarose, wurde in der Mikrowelle aufgekocht und

anschließend auf dem Magnetrührer unter Rühren auf ca. 60°C abgekühlt, mit 0,5 µg Ethidiumbromid pro ml Gel versetzt und anschließend in die Kammer gegossen und mit Kämmen bestückt, die die Aussparungen für das spätere Auftragen der Proben formten. Die Dokumentation der Gele erfolgt mit dem Fluor-S™ MultiImager und der Software Quantity One® S Version 4.3.1.

TBE – Puffer pH 8,3

Tris	0,1	M
Borsäure	0,1	M
EDTA	3,0	mM

Probenpuffer

Bromphenolblau	0,25	%(v/v)
Ficoll Puffer Typ 400 in 1 % TBE	10	%(v/v)

2.2.3.6 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das *QIAquick Gel Extraction* Kit verwendet. Dabei wurde eine hochmolare Lösung des Salzes Natriumperchlorat zu dem Gelstück gegeben und das Gel irreversibel bei 50°C aufgelöst. Anschließend wurde die DNA an eine Anionenaustauschsilikat-Säule gebunden und nach einigen Waschschritten mit TE-Puffer pH 8,5 eluiert.

2.2.4 Enzymatische Modifikationen von DNA

2.2.4.1 Restriktionsspaltung von DNA

DNA wurde durch Restriktionsendonukleasen verschiedener Hersteller gespalten und weiterverarbeitet. Analytische Restriktionsansätze hatten ein Gesamtvolumen von 10 µl, präparative Ansätze bis zu 50 µl. Je nach Reaktionsdauer und Herstellerempfehlung wurden Restriktionsenzyme im Überschuß eingesetzt (1–5 U Restriktionsenzym/µg DNA). Für die simultane Verwendung von zwei unterschiedlichen Enzymen wurde, soweit möglich, ein mit beiden Enzymen kompatibler Puffer eingesetzt. Wenn dies nicht möglich war, wurde die DNA zwischen beiden Reaktionen aufgereinigt (Montage™ PCR Units oder über Gelextraktion [2.2.3.6]), um einen Pufferwechsel zu ermöglichen. BSA wurde entsprechend

den Herstellerempfehlungen in einer Endkonzentration von 100 µg/ml eingesetzt. Die Reaktion erfolgte entweder über Nacht oder über 2 h mit anschließender erneuter Zugabe von 1 - 5 U Enzym für weitere 2 h bei optimaler Temperatur für das verwendete Enzym. Anschließend wurde das Enzym entweder durch Hitze (20 min bei 65–80°C) inaktiviert oder der Ansatz direkt auf ein DNA-Agarosegel aufgetragen.

Analytischer Restriktionsverdau

DNA	~1 µg
10 x Restriktionspuffer	1 µl
Restriktionsenzym	2 – 5 U
ddH ₂ O	ad 10 µl

Präparativer Restriktionsverdau

DNA	10 - 12 µg
10 x Restriktionspuffer	5 µl
Restriktionsenzym	10 - 25 U
ddH ₂ O	ad 50 µl

2.2.4.2 Dephosphorylierung linearisierter DNA-Fragmente

Die *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (CIAP) katalysiert die Abtrennung der 5'-Phosphatgruppe von DNA und RNA, wodurch eine Religation von Vektor-DNA nach erfolgreichem Restriktionsverdau verhindert wird. Die Dephosphorylierung von Vektor-DNA wurde direkt im Anschluß an den Restriktionsverdau durchgeführt. Zum hitzeinaktivierten Restriktionsansatz wurden 6 µl CIAP-Pufferkonzentrat (10x) und 3 µl CIAP-Enzym (3 U/µl) gegeben und der Ansatz auf 60 µl mit autoklaviertem Aqua bidest. aufgefüllt. Zum Entfernen der 5'-Phosphatgruppen wurde der Reaktionsansatz 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine 20-minütige Inkubation bei 65°C beendet. Es schloss sich sofort eine Phenol/Chloroform-Extraktion an. Dazu wurden zu 100 µl dephosphorylierter Vektorlösung 50 µl einer Mischung aus 25 Teilen Phenol / 24 Teile Chloroform / 1 Teil Isoamylalkohol zugegeben und durch Schütteln gemischt. Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit in der Biofuge pico für 3 Minuten trennte die organische von der wässrigen Phase. Die wässrige obere Phase wurde abpipettiert und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 10 µl 3 M Natriumacetat-Lösung pH 5,2 und 1 µl Glykogen (20 mg/ml) zugegeben. Danach

wurde die DNA mit 300 µl kaltem Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit in der Biofuge fresco für 15 Minuten sedimentiert. Das Pellet wurde mit kaltem 70% Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 20-25 µl ddH₂O gelöst. Der anschließende Test auf Eigenligation bestätigte den Erfolg der Dephosphorylierung. Der lineare Vektor wurde bei –20°C gelagert.

Das hier beschriebene Verfahren der Dephosphorylierung von DNA-Enden wurde nicht bei allen Ligationen verwendet. Häufig wurde die Religation des Vektors auch durch einen 5- bis 10-fachen Überschuß an DNA-Insert kompetitiv unterdrückt.

2.2.4.3 Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden

Für das Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden wurde das Enzym *DNA-Polymerase I Large Fragment* (Klenow Enzym) verwendet. Die DNA Fragmente wurden durch Gelextraktion aufgereinigt. Nach Zugabe von 5 µl dNTPs (2 mM), 5 µl Klenow Pufferkonzentrat (10x) und 3 µl Klenow Fragment (10 U/µl) zu 37 µl DNA-Lösung wurde der Ansatz gut gemischt und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte bei 65°C für 20 min.

2.2.4.4 Generieren von 5'-A-Überhängen an DNA-Fragmenten

Für DNA-Fragmente, die anschließend in einen PCR-XL-TOPO-Vektor ligiert werden sollten, war ein Adenosin-Überhang (A-Überhang) erforderlich. Taq-Polymerasen, nicht aber *proof-reading* Polymerasen, generieren einen A-Überhang am Ende von Fragmenten. Dazu wurden unten aufgeführte Komponenten gemischt und bei 72°C für 10 Minuten inkubiert.

A-Überhang generieren

dNTP (2 mM)	2,5	µl
10 x PCR-Puffer (Qiagen)	5	µl
Taq-Polymerase (Qiagen)	0,5	µl
PCR-Produkt	30	µl
ddH ₂ O	ad 50	µl

2.2.5 Sequenzanalyse

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Plasmidkonstrukte wurden zur Kontrolle sequenziert. Für diese Sequenzierungen wurde der Mehrkanal-Kapillarsequenzierer und das dazugehörige

Sequenzier-Kit der Firma Applied Biosystems verwendet. Zunächst wurde dafür eine Sequenzier-PCR durchgeführt, in der neben dNTPs (Desoxytriphosphate) auch fluoreszenzmarkierte ddNTPs (Didesoxynukleotidtriphosphate) zum Abbrechen der Reaktion an einer zufälligen Stelle enthalten waren. Den ddNTPs fehlte die 3'-OH-Gruppe, die zur Kettenverlängerung erforderlich ist [63]. Für jedes ddNTP wurde dabei ein anderer Fluoreszenzfarbstoff verwendet. Die anschließende Kapillarelektrophorese mit Fluoreszenzdetektion ermöglichte es die genaue Sequenz über 700 bp bis 900 bp zu ermitteln.

Für die PCR-Amplifikation wurden DNA-Mengen zwischen 200 ng und 500 ng pro 10 µl-Ansatz zusammen mit 1 µl des entsprechenden Sequenzier-Primers (10 µM) und 1,8 µl BigDye-Mix (ddNTPs, DNA-Polymerase, MgCl₂ und Puffer) verwendet.

Sequenzierungs-PCR

DMSO	0,5 µl
Primer (10 µM)	1 µl
BigDye®	1,8 µl
ddH ₂ O	5,7 µl
DNA	1 µl

PCR-Bedingungen

Stufe	Temperatur	Zeit	
Taq-Polymerase	94 °C	2 min	
Aktivierung			
Denaturierung	96 °C	15 s	25 x
Anlagerung	56,5 °C	15 s	
Verlängerung	60 °C	4 min	
Finale	72 °C	7 min	
Verlängerung			
Abkühlung	4 °C		

Das Produkt der Sequenzier-PCR wurde über Sephadex G50 superfine (Amersham) gereinigt. Dazu wurde das Sephadex-Pulver, mit einer Lochplatte (MultiScreen Column Loader, Millipore) portioniert, in 96er Filterplatten (MAHV-N45, Millipore) gegeben. Nach Zugabe von 300 µl ddH₂O und Quellung über 3 h, wurde bei 650 x g für 5 Minuten zentrifugiert.

Nach der Zugabe von weiteren 150 µl ddH₂O und nochmaliger Zentrifugation wurden dem Sequenzier-PCR-Produkt 30 µl ddH₂O zugesetzt und die Lösung auf die gequollene Säule pipettiert. Durch Zentrifugation in eine neue Mikrotiterplatte unter oben angegebenen Zentrifugationsbedingungen wurde das PCR-Produkt gereinigt und anschließend im Kapillarsequenzierer sequenziert.

Die Auswertung der Sequenzdateien (.abi) erfolgte mit der PC-Software *Sequencing Analysis* (Applied Biosystems), *Staden Package* (SourceForge.net) und Klonmanager (SECentral). Vergleiche mit den Sequenzdatenbanken EMBL und Genbank wurden mit Hilfe des Blast-Programms über den *Webserver* www.ncbi.nlm.nih am NIH (USA) vorgenommen.

2.2.5.1 Sequenzierung des Bereiches vor Exon 2 des HTR3B-Gens

Der Bereich +2116 bis +4637 der Sequenz GI51511727 (siehe Anhang) wurde mittels PCR amplifiziert. Dazu wurden die Primer HTR3B_P2_f2 und HTR3B_P2_r2, die *Long-expand-polymerase* mit dem BM1 Puffer in einem Endvolumen von 30 µl verwendet. Die PCR-Bedingungen waren: 94°C 2 Minuten anschließend 35 Zyklen mit je 96°C für 10 Sekunden, 57°C 20 Sekunden und 68°C für 5 Minuten. Darauf folgten 7 Minuten bei 68°C. Dieses PCR Produkt wurde mit den Primern HTR3B_P2_f2, HTR3B_P2_r2 sowie HTR3B_res_f und HTR3B_res_r [2.1.5.5] sequenziert. Siehe hierzu Abschnitt 2.2.5.

2.2.6 RLM 5' RACE

Die Methode des *Rapid Amplification of cDNA ends* (RLM 5' RACE) wurde erstmalig beschrieben von Suzuki et al. [64] und garantiert die selektive Amplifikation von 5'-Enden mit intakten mRNAs. Der verwendete RLM 5'RACE Kit ermöglichte die Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes eines Gens unter Ausschluss falsch positiver Ergebnisse aus degradierter mRNA, rRNA, tRNA und aus DNA. Durch die Behandlung der mRNA mit *Calf Intestine Phosphatase* wurden im ersten Schritt die 5'-Phosphatreste bei allen vorhandenen unerwünschten Nukleinsäuren entfernt, während die 5'-Enden der mRNA durch ihre Kappe (7-Methyl-Guanidin und 3 Phosphatgruppen) vor der Phosphatase geschützt wurden. Anschließend wurden die 5'-Enden der vollständigen mRNA durch die Behandlung mit saure Tabak-Pyrophosphatase (TAP) auf ein 5'-Phosphat reduziert. Danach erfolgte die Ligation des Ambion-Adapter-Primers und darauf eine (nested) PCR mit dem RACE_outer_Ambion_f-Primer und dem entferntesten genspezifischen Rückwärtsprimer, gefolgt von einer weiteren PCR mit dem RACE_inner_Ambion_f-Primer und einem innen liegenden genspezifischen Rückwärtsprimer. In wenigen Fällen wurde noch eine PCR mit

dem RACE_inner_Ambion_f-Primer und noch einem weiteren Rückwärts-Primer durchgeführt. Die PCR Produkte wurden sofort in PCR-XL-TOPO-Vektoren [2.2.8.2] kloniert und die Transkriptionsstartpunkte mittels Sequenzanalyse [2.2.5] unter Verwendung der Primer M13 forward and reverse, bestimmt. Das Procedere unter Auslassen der Durchführung der TAP-Behandlung diente der Kontrolle des Verfahrens. In Abbildung 5 ist die Lokalisation der verwendeten Primer dargestellt.

Tabelle 2-1 Primer für den 5'-RACE-Versuch

Name der verwendeten Primer	5' – 3' Sequenz
RACE_rev_r6	AGA GGT AGG GAG ATC TCT CTA ATC
RACE_rev_r5	ATC AAA CAT GCT GGA GTT CCA GGA
RACE_rev_r1	CAT GGA CGA ACA GGT CCA GGT AGA
RACE_rev_r4	TGG CCT TGG TCC AGT TGT AAA
RACE_rev_r2	CCT TGG TCC AGT TGT AAA CAG GTC
RACE_outer_Ambion_f	GCT GAT GGC GAT GAA TGA ACA CTG
RACE_inner_Ambion_f	CGC GGA TCC GAA CAC TGC GTT TGC TGG CTT TGA TG
Ambion-Adapter-Primer	GCU GAU GGC GAU GAA UGA ACA CUG CGU UUG CUG GCU UUG AUG AAA

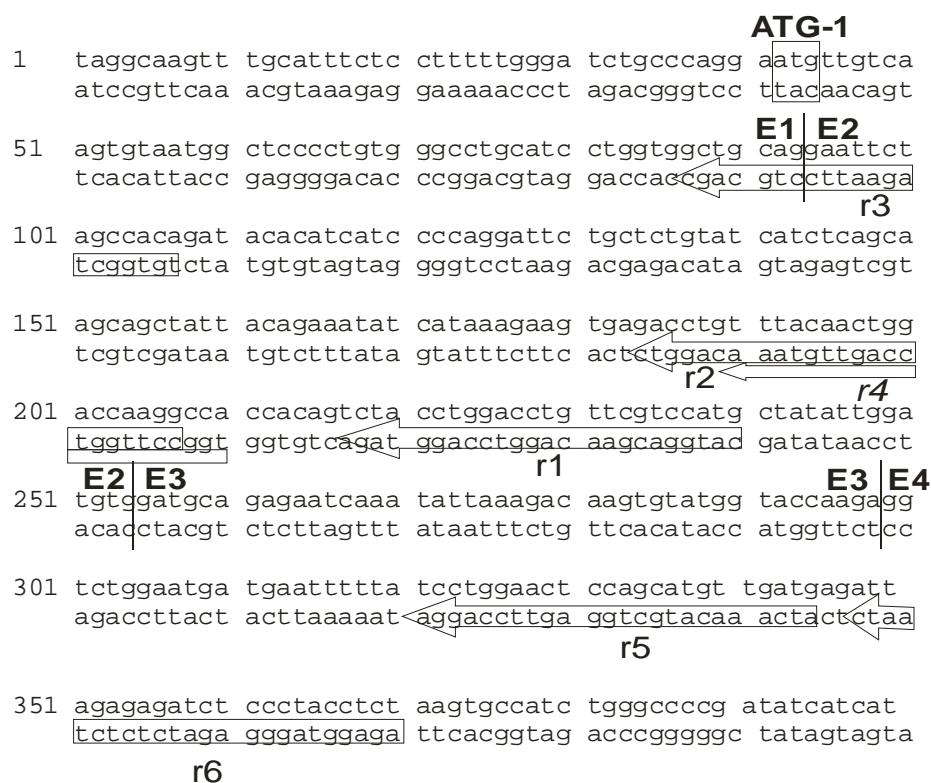


Abbildung 5: Eingetragen sind die RACE-Primer in die mRNA Sequenz des HTR3B-Gens. Das ATG-1 (der Transkriptionsstart wie er in AF169255 NCBI-Datenbank angegeben ist) ist eingerahmt. Die Exongrenzen sind durch vertikale Linien markiert.

Die RACE-PCRs wurden mit 10 µl der cDNA aus dem RACE-Procedere begonnen. Für die PCR der cDNA aus dem Gehirn (Gehirn total, *Amygdala*, *Hippocampus* und *Nucleus caudatus*) wurde zunächst eine PCR mit dem Primer RACE_rev_r6 und RACE_outer_Ambion_f, anschließend eine PCR mit 3 µl PCR-Produkt und dem Primerpaar RACE_inner_Ambion_f und RACE_rev_r1 durchgeführt. Die cDNAs aus Dün- und Dickdarm wurden in der ersten PCR mit den Primern RACE_outer_Ambion_f und RACE_rev_r6, anschließend in der zweiten PCR mit 3 µl PCR-Produkt mit den Primern RACE_inner_Ambion_f RACE_rev_r4 amplifiziert. Für die Zelllinien, die das Gen insgesamt schwächer exprimieren, wurden drei aufeinander folgende PCRs durchgeführt. Für CaCo-2-Zellen wurden zunächst 10 µl der cDNA-Flüssigkeit mit den Primern RACE_outer_Ambion_f und RACE_rev_r1 amplifiziert, es folgte eine PCR mit 10 µl PCR-Produkt mit dem Primerpaar RACE_inner_Ambion_f und RACE_rev_r4 und abschließend eine PCR mit 3 µl PCR-Produkt mit den Primern RACE_inner_Ambion_f und RACE_rev_r2. 10 µl Lan-1-cDNA aus dem RACE Procedere wurde zunächst mit dem Primerpaar RACE_outer_Ambion_f und RACE_rev_r6 amplifiziert. Anschließend wurde eine PCR durchgeführt mit 3 µl PCR-Produkt und den Primern RACE_inner_Ambion_f und RACE_rev_r5 und abschließend mit RACE_inner_Ambion_f und RACE_rev_r2. Die Auswahl der Primer für die PCRs wurde nicht systematisch ermittelt. Sobald eine PCR im Agarosegel eindeutige Banden zeigte, wurde zum Schritt der Klonierung übergegangen. Die RACE-PCR entsprach der Standard-PCR [2.2.3.1], nur dass die PCR-Bedingungen wie folgt gewählt wurden:

RACE-PCR-Bedingungen

Stufe	Temperatur	Zeit	
	94 °C	3 min	
Denaturierung	94 °C	30 s	Zyklische Wiederholung 35 x
Anlagerung	55 °C	30 s	
Elongation	72 °C	1 min	
Finale Elongation	72 °C	7 min	
Kühlung	8 °C		

2.2.7 Einführen von Varianten in Plasmidkonstrukte

Zur Einführung von Varianten in ein bestehendes Plasmidkonstrukt wurde das QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit verwendet. Die Methode beruht auf einer PCR auf dem Mutterplasmid mit zwei komplementären Oligonukleotiden, die die gewünschte Mutation enthalten. Nach der PCR wurde der komplette Ansatz mit dem Enzym DpnI verdaut. DpnI verdaut ausschließlich methylierte DNA. Da nur die Mutterplasmide aus *E. coli* Amplifikation stammten und damit methyliert wurden, blieben nur die Varianten-tragenden durch PCR generierten Tochterplasmide zurück. Anschließend wurden die neuen Plasmide in XL-1-Blue superkompetente *E. coli*-Bakterien transformiert. Obwohl dieser Kit die fast fehlerfrei amplifizierende PfuTurbo DNA Polymerase (nur $1,3 \times 10^{-6}$ Fehler pro Base pro Duplikation) enthielt und durch wenige Amplifikationszyklen nicht gewünschte und damit zufällige Mutationen relativ unwahrscheinlich macht, wurden um zufällige Mutationen im Plasmid zu minimieren, in dieser Arbeit die Mutation in den entsprechenden pCR-XL-TOPO-Klon eingeführt und anschließend der mutierte DNA-Abschnitt umklont in den Expressionsvektor pXP2. Der Erfolg der Prozedur wurde mittels Sequenzanalyse [2.2.5] sichergestellt.

In dieser Arbeit wurde das QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit verwendet, um die -100/-102 AAG Deletionsvariante in das Wildtyp-Konstrukt im pCR-XL-TOPO-Klon einzuführen. Die verwendeten Primer waren QuickChange_Del_F/R. Im Anschluss an das QuikChange Procedere wurde das mutierte Fragment umklont in den Luziferase-Reportergen-Vektor pXP2.

2.2.8 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.2.8.1 Ligation mit T4-DNA-Ligase

Die geschnittenen und gereinigten DNA Fragmente wurden im Verhältnis 5 - 10 : 1 mit nicht-dephosphoryliertem geschnittenem Vektor, bei Verwendung von dephosphoryliertem Vektor im Verhältnis 3 : 1 gemischt und auf 17 µl Volumen mit ddH₂O aufgefüllt. Für eine 20 µl Reaktion wurden 2 µl 10 x Ligasepuffer, 1 µl T4-DNA-Ligase (5 U/µl) zugegeben und der Ansatz über Nacht bei 12°C inkubiert. Zur Reinigung wurde eine Dialyse der Plasmide für 30 Minuten mittels Dialysefilter durchgeführt. Anschließend wurden die Plasmide transformiert [2.2.9.9].

Eine sehr zeitsparende und effiziente Anwendung der T4-Ligation war die Ligation mittels Quick Ligation® Kit der Firma New England Biolabs. Hier wurden für einen 20 µl Ansatz 6 µl Fragmentlösung (~ 1 µg DNA), 1 µl geschnittener Vektor (min 50 ng), 10 µl

2 x Ligationspuffer und 1 µl Quick T4 DNA Ligase gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Eine Dialyse der Produkte mit darauf folgender Transformation wurde angeschlossen.

2.2.8.2 TOPO-Ligation

Die Topo-TA-Klonierung ist eine Methode zur Klonierung von PCR-Produkten in einem einzigen Reaktionsschritt. Diese Methode basiert auf der Gegebenheit, dass die in PCR-Reaktionen verwendete Taq-Polymerase an die 3'-Enden der synthetisierten DNA-Stränge ein einzelnes Desoxyadenosin anhängt. Diese Tatsache wird im TOPO-TA-Kloning genutzt. Der Vektor wurde von der Firma Invitrogen mit der Topoisomerase I des Vaccinia Virus vorbehandelt. Danach liegt der Vektor linearisiert mit einzelnen 3'-Thymidin-Überhängen vor und hat das Enzym Topoisomerase I kovalent an das 3'-Phosphat des geschnittenen Vektors gebunden. Bei der Ligation eines PCR-Fragmentes liefert die gebundene Topoisomerase I die Energie zur Bindung des Fragmentes an den Vektor. Die Topoisomerase I wird in diesem Schritt wieder freigesetzt.

In dieser Arbeit wurde ausschließlich das pCR-XL-TOPO-System auch für kleinere Fragmente entgegen den Empfehlungen des Herstellers verwendet. Aus Kostengründen wurde mit 0,5 µl nur die Hälfte des empfohlenen Volumens an Vektor verwendet. Die Ansätze wurden wie folgt pipettiert:

TOPO-Ligation

DNA-Fragment Lösung	4,5	µl
<i>TOPO XL® PCR Cloning</i> Vektor	0,5	µl

Es wurde exakt 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert gefolgt von der Zugabe von 1 µl der dem Kit beiliegenden Salz-Stop-Lösung (0,3 M NaCl, 0,06 m MgCl₂). Anschließend wurde das Ligationsprodukt entweder direkt mittels Hitzeschock-Transformation [2.2.9.8] transformiert oder nach vorheriger Dialyse (Dialysefilter VSWP01300, Millipore) der Transformation mittels Elektroporation unterzogen [2.2.9.9].

2.2.8.3 Klonierung der DNA-Abschnitte Promotor 1 und Promotor 2 in Luziferase-Reportergen-Vektoren

Es wurden Luziferase-Reportergen-Konstrukte generiert mit den Bereichen „Promotor 1“ und „Promotor 2“ des HTR3B-Gens. Als Reportergen-Vektor diente pXP2 [2.1.5]. Für die

Konstrukte wurden zunächst die Bereiche P1 und P2 per PCR amplifiziert. Als Matrize diente die Patienten-DNA eines nicht die Deletion tragenden Patienten für P1 zusätzlich auch die DNA eines die Deletion tragenden Patienten. Es wurde für das P1 Konstrukt der Bereich -2137 Basenpaare oberhalb des ATG_1 bis +28 bp hinter ATG_1 amplifiziert, die Konstruktgröße betrug 2164 bp. Es wurden die Primer HTR3b_2kb_F und HT_3B_4inframe verwendet. Nach dem gleichen Procedere wurde die P2 Region +2464 bis +4539 Basenpaare unterhalb des ATG_1 amplifiziert (Fragmentgröße: 2075 bp) mit den Primern HTR3B_P2_F/R. Alle Primer enthielten eine Xma I-Schnittstelle an ihrem 5'-Ende, die für die Klonierung in den Luziferase-Reportergen-Vektor erforderlich war. Die P1 PCR-Reaktion wurde mit der *Long Expand Polymerase* (Puffer BM3), die PCR-Reaktion für P2 mit der *KOD-HiFi-DNA Polymerase* durchgeführt. Die Anlagerungstemperatur für P1 betrug 61°C, die für P2 58°C. Es wurden 35 Zyklen eingesetzt und sonst die vom Hersteller der jeweiligen Polymerase empfohlenen Bedingungen verwendet. Die Produkte wurden zunächst in den pCR-XL-Topo-Vektor kloniert und dann unter Zuhilfenahme der künstlich eingebauten Xma I-Schnittstellen in den Luziferase-Reportergen-Vektor pXP2 umkloniert. Es wurden Klone mit richtiger und invertierter Orientierung isoliert. Die Kontrolle der Konstrukte erfolgte durch Schneiden mit Xma I, Pst I und EcoR I und mittels Sequenzanalyse. Im Folgenden werden die Konstrukte in denen P1 in der richtigen Orientierung in pXP2 kloniert ist mit HTR3B:P1 bezeichnet und das entsprechende P2 Konstrukt nach dem gleichen Prinzip HTR3B:P2 [Abbildung 6].

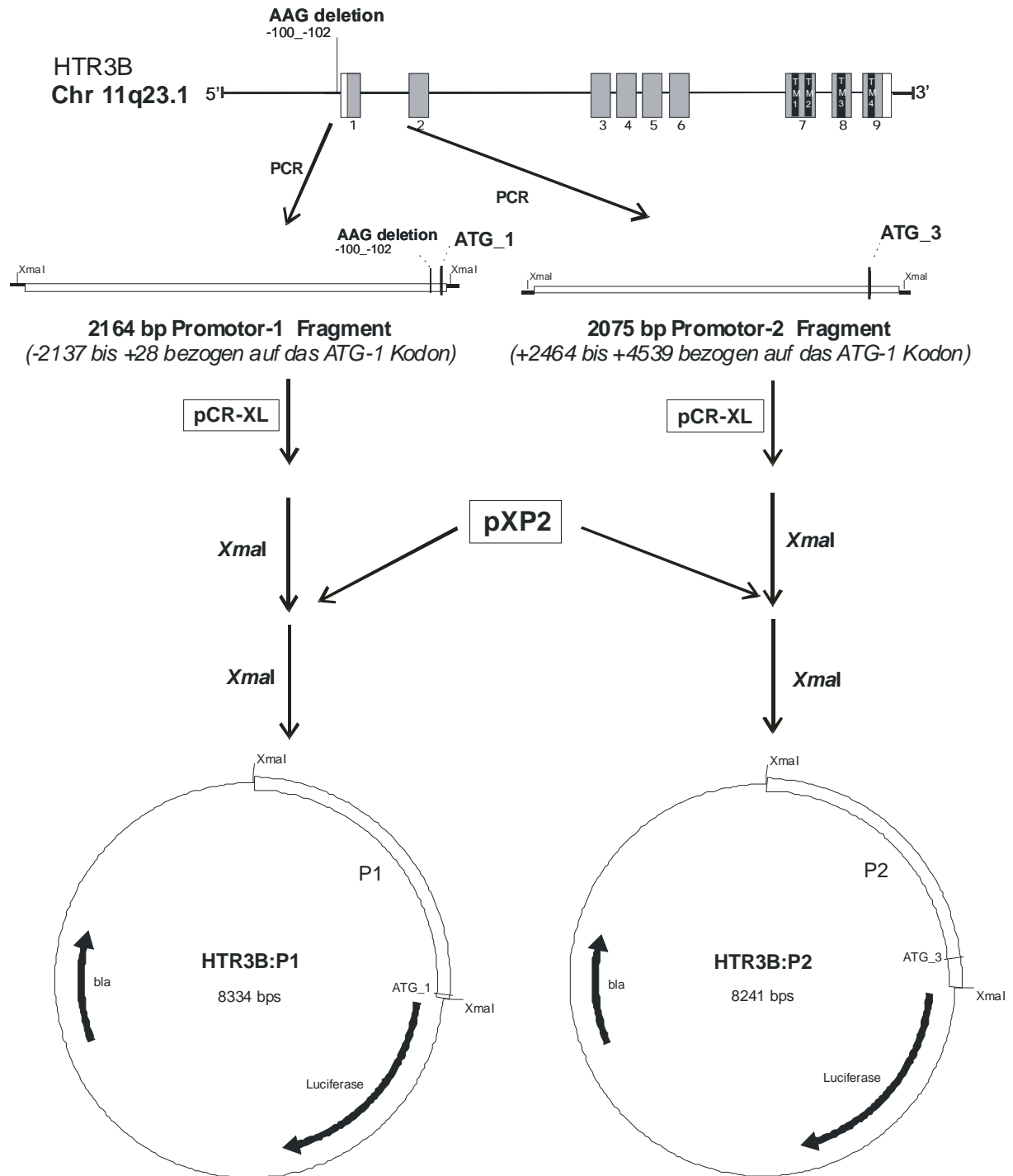


Abbildung 6: Klonierung des Promotor-1 (P1) und des Promotor-2 (P2) Fragmentes in den Luziferase-Reportergen-Vektor pXP2. Die Positionsangaben beziehen sich auf das A des ATG-1 Kodons, dem Startkodon, das in der NCBI-Datenbank als Translationsstartpunkt angegeben ist (z.B. AF169255).

Klonierung des Promotor-2-Fragmentes:

PCR mit *KOD-HiFi-DNA-Polymerase*

dNTPs (10 mM)	5,0 µl
Vorwärts-Primer (10 µM)	1,0 µl
Rückwärts-Primer (10 µM)	1,0 µl
<i>KOD-HiFi-DNA-Polymerase</i>	0,4 µl
10 x Puffer #2	5,0 µl
DNA	1,0 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

Klonierung des Promotor-1-Fragmentes und des 1 kb-Fragmentes des Promotor-1:

PCRs mit *Long Expand Polymerase*

dNTPs (10 mM)	1,0 µl
Vorwärts-Primer (10 µM)	0,5 µl
Rückwärts-Primer (10 µM)	0,5 µl
<i>Long Expand Polymerase</i>	0,2 µl
10 x Puffer BM3	2,5 µl
DNA	1,0 µl
ddH ₂ O	19,3 µl

2.2.8.4 Klonierung der verkürzten Promotor-1-Luziferasekonstrukte

Als Ausgangskonstrukt für alle verkürzten P1 Plasmide diente HTR3B:P1 (8334 bp). Es wurde ein 1182 kb, ein 821 bp, ein 538 bp, ein 286 bp und ein um die Basen -523 bis -259 bezogen auf das ATG-1 (s. Anhang) im 3'-Bereich verkürztes Konstrukt generiert. Alle Konstrukte enthielten die Region, in der an der Position -100/-102 die AAG Deletionsvariante vorkommen kann. Die Kontrolle der Konstrukte erfolgte in den Fällen, in denen eine PCR verwendet wurde mittels Sequenzanalyse in allen Fällen jedoch durch Restriktionsverdau.

Durch Schneiden des Ausgangskonstruktes HTR3B:P1 mit Hind III und Btg I wurde ein Fragment aus dem Plasmid geschnitten. Der verbleibende gekürzte linearisierte Vektor wurde mit Klenow Enzym behandelt und anschließend religiert. Das Produkt war ein pXP2-Vektor, der ein 286 bp Fragment des HTR3B-Gens enthielt, im Folgenden pXP2_HTR3B:286bp genannt. Analog dazu wurde ein Plasmid generiert, das 821 bp des HTR3B-Gens enthielt mit dem gleichen Procedere nur unter Verwendung der Enzyme

Hind III und BfrB I. Dieses Konstrukt wird im Folgenden pXP2_HTR3B:821bp genannt. (Die Klonierung ist nicht in Abbildungen dargestellt.)

Das Konstrukt HTR3B:1kb, das 1182 bp des Gens enthielt, wurde analog dem P1 Konstrukt durch PCR auf der genomischen DNA des nicht die Deletion tragenden Patienten generiert. Die PCR-Bedingungen und die verwendete Polymerase waren identisch mit denen bei der P1-PCR [2.2.8.3], die Primer HT_3B_4inframe und HTR3b_1kb_F wurden verwendet. Es erfolgte eine Zwischenklonierung in pCR-XL-TOPO-Vektor und danach eine Umklonierung mit Hilfe des Enzyms Xma I.

Des Weiteren wurde ein 538 bp großer Abschnitt des Gens kloniert. Hierzu wurde eine PCR durchgeführt mit den Primern 5HT3B_500bp f/r und unter Verwendung der Pfu-Polymerase. Als Matrize diente wieder das Ausgangskonstrukt HTR3B:P1. Der Rückwärtsprimer lag auf dem pXP2-Rückgrat, so dass die Xma I-Schnittstelle mit im Produkt erhalten blieb. Der Vorwärtsprimer führte künstlich eine Hind III-Schnittstelle ein. Gleich nach der PCR wurde ein A-Überhang durch Nachbehandlung mit Taq-Polymerase generiert und direkt anschließend wurde das PCR-Produkt in den pCR-XL-TOPO-Vektor kloniert. Sowohl dieses pCR-XL-TOPO-Konstrukt als auch der pXP2-Leervektor wurden mit Hind III und Xma I geschnitten und nach der Gelaufreinigung ligiert. Es entstand ein Konstrukt, das 538 bp des Gens enthielt und im Folgenden HTR3B:538bp genannt wurde [Abbildung 7].

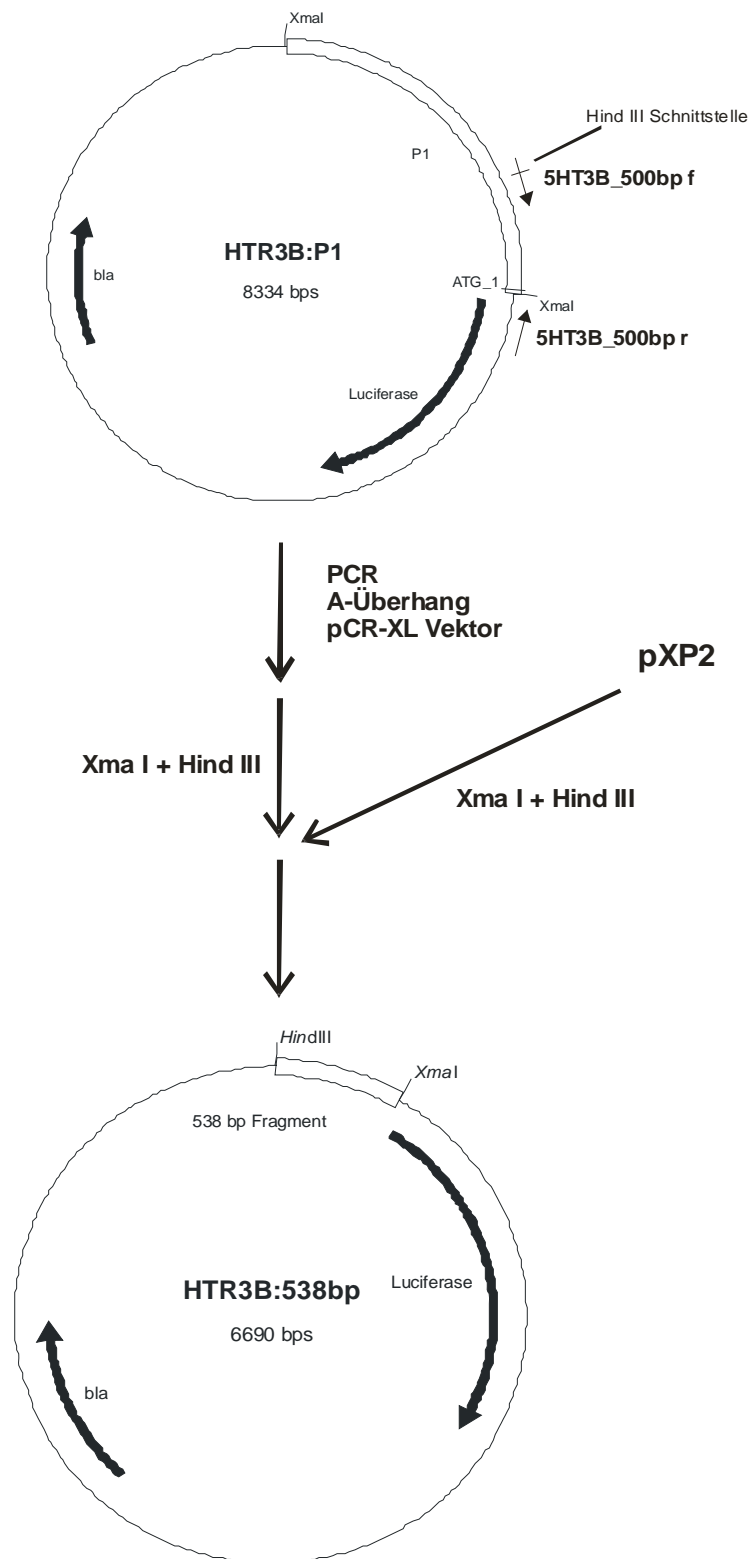


Abbildung 7: Klonierung des 538 bp-Fragmentes in den Luziferase-Reporter-gen-Vektor pXP2.

Zusätzlich wurde ein Plasmid generiert, das das P1-Fragment enthielt, in dem jedoch eine Region von 264 bp im Bereich -523 bis -259 bp bezogen auf das ATG-1 (s. Anhang) entfernt wurde. Das geschah durch eine PCR auf dem Ausgangsplasmid mit den Primern

PCR_3'verk_f/r und anschließendes Schneiden des Produktes mit Btg I und parallel durch ein Schneiden des Ausgangsplasmids mit Btg I. Die darauf folgende Ligation führte zum gerichteten Einbau des PCR-Fragmentes. Dieses verkürzte Konstrukt wurde mit HTR3B:3'verk bezeichnet [Abbildung 8].

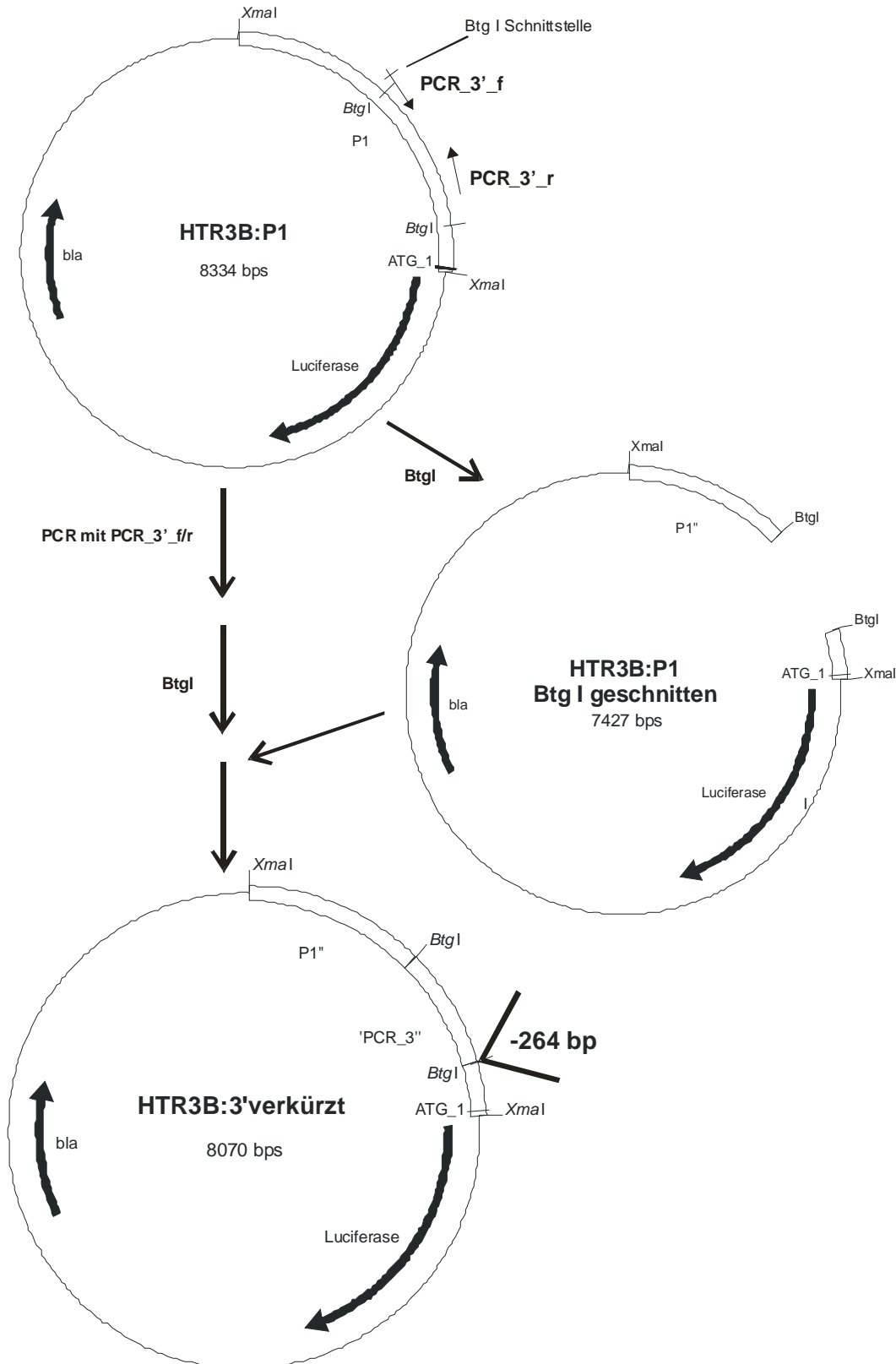


Abbildung 8: Klonierung des 3'-verkürzten Fragmentes in den Luziferase-Reporter-Gen-Vektor pXP2.

2.2.8.5 Klonierung der Tandem-Luziferasekonstrukte

Es wurden mit dem Luziferase-Reporter-Gen-Vektor pGl3Promotor Konstrukte erzeugt, die die polymorphe Stelle mit oder ohne Del-Polymorphismen 3-fach hintereinander kloniert enthielten. Dazu wurden die Oligonukleotide Tandem_ins_s1, Tandem_ins_s2_BglII, Tandem_ins_as1 und Tandem_ins_as2_BglII und analog für die Deletionsvariante Tandem_del_s1, Tandem_del_s2_BglII, Tandem_del_as1 und Tandem_del_as2_BglII verwendet, die nach der Ligation DNA-Fragmente lieferten, die am 5'-Ende eine Kpn I-Schnittstelle und am 3'-Ende eine Bgl II-Schnittstelle mit schon überhängenden Enden hatten. Zunächst wurden die *Sense* und die entsprechenden *Antisense* Primer durch Erhitzen auf 95°C und anschließend langsames Abkühlen [2.2.13.1.1] zu doppelsträngigen DNA-Stücken aneinandergelagert. Im Anschluß wurde unter Verwendung von T4-Ligase das dreifach die polymorphe Region enthaltende DNA Stück in den mit Kpn I und Bgl II geschnittenen pGl3Promotor-Vektor ligiert [2.2.8.1]. Die auf diese Weise erhaltenen Plasmide wurden mittels Sequenzanalyse überprüft.

2.2.8.6 Klonierung des offenen Leserahmens aus humaner Gehirn-mRNA

Zur Klonierung der cDNA des HTR3B-Gens wurde mRNA aus menschlichem Gehirngewebe unter Verwendung des genspezifischen Primers Genspez_HTR3B_revtrans anstelle der Hexanukleotide [2.2.11.3] selektiv revers transkribiert. Anschließend wurde eine PCR zur Amplifikation angeschlossen unter Verwendung der Primer E1b_f [3.2.4] und HTR3B_cDNA_ORF_r. Danach folgte eine weitere PCR mit demselben Rückwärtsprimer und dem weiter 3'-liegenden Vorwärtsprimer E2/3_f [3.2.4]. Für beide PCRs wurde die *Long Expand Polymerase* verwendet.

PCRs mit *Long Expand Polymerase*

dNTPs (10 mM)	2,0 µl
Vorwärts-Primer (100 µM)	1,0 µl
Rückwärts-Primer (100 µM)	1,0 µl
<i>Long Expand Polymerase</i>	0,7 µl
10 x Puffer BM1	5,0 µl
DNA	1,0 µl
ddH ₂ O	36,5 µl

PCR-Bedingungen

Stufe	Temperatur	Zeit		
Denaturierung	94 °C	2	Minuten	
Denaturierung	94 °C	10	Sekunde	
		n		
Anlagerung	53 °C	30	Sekunde	Zyklische
		n		Wiederholung
				10 x
Elongation	68 °C	3	Minuten	
Denaturierung	94 °C	15	Sekunde	
		n		
Anlagerung	55 °C	30	Sekunde	Zyklische
		n		Wiederholung
				24 x
Elongation	68 °C	3,3	Minuten	
Finale Elongation	72 °C	10	Minuten	
Kühlung	8 °C			

Das Produkt wurde sofort in den pCR-XL-TOPO-Vektor kloniert und anschließend sequenziert.

Einer der so generierten Klone wurde auch zur Quantifizierung in Genexpressionsuntersuchungen [2.2.12.4] verwendet.

2.2.9 Arbeiten mit Bakterien

2.2.9.1 Kulturmedien für Bakterien

Luria-Bertani (LB) Medium wurde zur Anzucht von Bakterien in flüssiger Kultur verwendet. Es wurde mit bidestilliertem Wasser angesetzt und anschließend autoklaviert. Zur Selektion wurde nach dem Abkühlen der Lösung das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Zur Herstellung von Agarplatten wurde das LB-Medium vor der Sterilisation mit 15 g Agar pro Liter Medium versetzt. Sowohl LB-Medium als auch die Agarplatten wurden bei 4°C aufbewahrt. Die Stammlösungen der Antibiotika wurden steril filtriert und bei -20°C gefroren gelagert.

Bakterienmedium

Mediumkomponenten	LB-Medium (pH 7,0)	LB-Agar-Platten
	% (w/v)	% (w/v)
Trypton	10	10
Hefeextrakt	5	5
NaCl	10	10
Agar		15

Antibiotikazusätze

Mediumzusatz	Stammlösung	Endkonzentration
	mg/ml	µg/ml
Ampicillin	50	100
Kanamycin	50	50
Chloramphenicol ²	25	12

2.2.9.2 Anzucht von Bakterien in Lösung

Zur Herstellung einer Bakteriensuspension wurde die gewünschte Menge LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion gemischt und anschließend mit einer Bakterienkolonie von der Agarplatte versetzt. Kulturen bis zu einem Gesamtvolumen von 5 ml wurden in sterilen 15 ml Röhrchen über Nacht leicht schräg stehend bei 37°C geschüttelt. Die Schräglage (~40°) konnte eine große Oberfläche für gute Sauerstoffversorgung der Bakterien gewährleisten. Ansätze mit 100 ml Kulturvolumen wurden in autoklavierten Glasflaschen (500 ml) über Nacht rotiert. Es wurde darauf geachtet, dass die Deckel der Gefäße nie fest verschlossen waren, so dass Luft und damit frischer Sauerstoff in die Flasche gelangen konnte.

2.2.9.3 Anzucht von Bakterien auf Agarplatten

Direkt nach der Transformationsprozedur sowie vor der Kolonie-PCR und zur kurzzeitigen Aufbewahrung von bestimmten Bakterienklonen wurden Bakterien auf Agarplatten ausgestrichen. Dazu wurden Agarplatten mit dem jeweiligen Antibiotikum mit Hilfe von sterilen Pipettenspitzen, sterilen Zahnstochern oder abgeflammt gebogenen Pasteurpipetten aus Glas mit Bakterien bestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C unter der

² Chloramphenicol wurde in Ethanol gelöst

Wärmehaube inkubiert. Zur weiteren Aufbewahrung wurden die Platten mit Parafilm verschlossen und bei 4-8°C gelagert.

2.2.9.4 Herstellung von Glycerinkryokulturen

Glycerinkryokulturen wurden aus den Über-Nacht-Kulturen der Plasmidpräparationen durch Zugabe des gleichen Volumens 50% Glycerins zu der Bakteriensuspension hergestellt. Diese Mischung wurde unverzüglich bei -80°C eingefroren.

2.2.9.5 Dichtebestimmung von Bakterienlösungen

Die Dichte einer Bakterienlösung konnte durch den Grad der Trübung der Lösung bestimmt werden. Dazu wurde 1 ml der Kultur gegen reines LB-Medium als Leerwert bei 600 nm (OD_{600}) gemessen. Bei OD_{600} -Werten von 0,05 bis 0,3 ist Linearität der optischen Dichte mit der Anzahl der Zellen gegeben.

2.2.9.6 Präparation chemisch-kompetenter Bakterien

Escherichia coli XL1-Blue wurden in 10 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 0,6 ml dieser Vorkultur in 100 ml LB-Medium gegeben (500 ml Glasflasche). Diese 100 ml LB-Medium wurden mit 0,25 ml 1 M Magnesiumsulfat und 0,25 ml 1 M Magnesiumchlorid versetzt, um das Wachstum der Zellen zu beschleunigen. Nach weiterer Inkubation unter Schütteln bei 37°C wurden die Zellen bis zu einer Dichte von OD_{600} 0,5 gewachsen. Anschließende Kühlung auf Eis über 20 Minuten stoppte das Wachstum der Bakterien. Von nun an wurden die Zellen ständig auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation über 15 Minuten bei 2 000 x g und 4°C geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml Transformationspuffer 1 resuspendiert. Nach einer Inkubation auf Eis für 60 bis 120 Minuten wurden die Zellen wie oben beschrieben zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml Transformationspuffer 2 aufgenommen. Die Zellen wurden in Aliquots von 200 µl bei -80°C aufbewahrt.

Transformationspuffer 1 (steril filtriert)

Kaliumacetat (pH 5,8)	30 mM
Rubidiumchlorid	100 mM
Manganchlorid	50 mM
Calciumchlorid	10 mM

Transformationspuffer 2 (steril filtriert)

MOPS (pH 7,0)	10 mM
Rubidiumchlorid	10 mM
Calciumchlorid	75 mM
Glycerol	15 % (v/v)

2.2.9.7 Präparation von elektro-kompetenten Bakterien

Eine Vorkultur aus 20 µl Bakterienstock (Top10 E. coli, Invitrogen) in 6 ml LB-Medium ohne Antibiotikum wurde über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert und anschließend gleichmäßig auf 3 x 200 ml LB-Medium aufgeteilt. Diese Kultur wurde bis zum Erreichen einer $OD_{600} = 0.65-0.8$ [2.2.9.5] kultiviert anschließend auf Eis abgekühlt und auf 12 vorgekühlte 50 ml-Röhrchen (Sarstedt) verteilt. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden auf Eis gekühlt oder bei 4°C (Zentrifuge) ausgeführt. Nach einer Zentrifugation für 10 Minuten bei 3220 x g wurden die Pellets in je 1 ml eiskaltem 10% Glycerin (autoklaviert und auf 4°C gekühlt) resuspendiert, auf 30 ml mit 10% Glycerin aufgefüllt und erneut 10 Minuten bei 3220 x g zentrifugiert. Nach Resuspension in je 1 ml eiskaltem 10% Glycerin wurden je 2 Pellets in 30 ml 10% Glycerin vereinigt und die Zentrifugation wiederholt (6 Röhrchen). Es erfolgte eine Resuspension in 30 ml 10% Glycerin und Zentrifugation für 10 min bei 3220 x g und eine weitere Vereinigung der Pellets (3 Röhrchen). Nach einer endgültigen Resuspension in 30 ml 10% Glycerin und Zentrifugation für 10 Minuten bei 3220 x g wurden die drei Bakterien-Pellets vorsichtig in je 400 µl 10% Glycerin resuspendiert. Die elektrokompetenten Bakterien wurden in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße (60 µl) aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.9.8 Transformation durch Hitzeschock

Um chemisch kompetente XL1-Blue Zellen [2.2.9.6] zu transformieren wurden 0,01-1 µg Plasmid-DNA zu den auf Eis aufgetauten Zellen gegeben. Nach einer 30 Minuten langen Inkubation auf Eis wurden die Zellen exakt 1,5 Minuten lang auf 42°C erhitzt (Thermostat plus, Eppendorf) und danach sofort auf Eis 3 Minuten gekühlt. Durch Zugabe von 800 µl LB-Medium wurden die Zellen mit Nährstoffen versorgt. Nach einer Inkubation bei 37°C unter der Wärmehaube wurde die Zellsuspension auf Antibiotika-haltigen Agarplatten [2.2.9.3] ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.9.9 Transformation durch Elektroporation

Für die Transformation des von Salzen gereinigten Ligationsproduktes (30 Minuten dauernde Dialyse) wurde ein Aliquot (60 µl) elektrokompenter Top10 E. coli [2.2.9.7] 30 Minuten auf Eis aufgetaut und mit 2–4 µl des Ligationsprodukts vorsichtig gemischt. Die Mischung wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 2 mm) überführt und im Elektroporator unverzüglich mit einem Hochspannungspuls (2500 V, 25 µF, 200 Ω) behandelt. Nach Zugabe von 500 µl vorgewärmtem LB-Medium in die Küvette wurde der gesamte Transformationsansatz in ein 15 ml-Röhrchen überführt und ca. 1 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend erfolgte das Ausplattieren von 10–300 µl transformierter Bakterien-Suspension auf Selektionsplatten (LB-Agar mit dem entsprechenden Antibiotikum, und Inkubation für 12–18 h bei 37°C [2.2.9.3]). Die entstandenen Kolonien wurden mittels einer Kolonie-PCR oder Minipräparation [2.2.3.2.1.1] und nachfolgendem Restriktionsverdau analysiert und gegebenenfalls sequenziert.

2.2.9.10 Kolonie-PCR

Durch die Kolonie-PCR war es möglich nach einer Transformation positive von negativen Klonen zu unterscheiden, ohne vorher die Plasmide zu isolieren. Es wurden Primer so ausgewählt, dass eine Bande auf dem Agarosegel nach erfolgter PCR das Vorhandensein und die richtige Orientierung des Inserts im Plasmid signalisierte. Dem Kolonie-PCR Mastermix wurde durch auf und ab pipettieren frisch gepickte Bakterienkolonie beigelegt. Es wurde eine PCR [2.2.3.1] mit folgenden Bedingungen durchgeführt, wobei es wichtig war einen 10 Minuten dauernden Schritt bei 95°C an den Beginn des PCR-Reaktion zu setzen, um die Bakterienzellen aufzuschließen und die vollständige Denaturierung der Plasmide zu gewährleisten.

Kolonie-PCR

dNTPs (10 mM)	0,4	µl
Vorwärts-Primer (100 µM)	0,1	µl
Rückwärts-Primer (100 µM)	0,1	µl
Taq-Polymerase (Qiagen)	0,2	µl
10 x Puffer Qiagen	2	µl
ddH ₂ O	ad 20 µl	µl
Frisch gepickte Bakterienkolonie		

Standard-PCR-Bedingungen

Stufe	Temperatur		Zeit		
Aufschluss der Bakterienzellen	95	°C	10	min	
Denaturierung	96	°C	30	s	Zyklische Wiederholung 30 x
Anlagerung	50	°C	30	s	
Elongation	72	°C	1	min/kb	
Finale Elongation	72	°C	5 - 10	min	
Kühlung	8	°C			

2.2.10 Zellkultur**2.2.10.1 Verwendete Zelllinien und Bedingungen**

Es wurden nur sterile Lösungen, Kulturmedien und Materialien verwendet. Medien wurden im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. Die Kultivierung aller verwendeten Zellen wurde bei 37°C, 5% CO₂ und in wassergesättigter Atmosphäre vorgenommen. Arbeiten fanden unter der Sterilbank statt. Es wurden zur Kultivierung stets Kulturflaschen mit 75 cm² Kulturoberfläche verwendet. Das Passagieren der Zellen fand zweimal pro Woche statt (Zellzahlen siehe Tabelle 2-2).

PBS-Puffer, pH 7,4

NaCl	140,0 mM
KCl	2,5 mM
Na ₂ HPO ₄	8,1 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM

2.2.10.1.1 PC-12-Zellen

PC-12-Zellen wurden als Suspensionszellen kultiviert. Für Versuche mit PC-12-Zellen wurden diese nach Collagenbeschichtung der Kulturoberfläche adhärent gewachsen. Zur Beschichtung wurde Collagen A 1:1 mit PBS verdünnt und dann je 1 ml pro 10 cm² dieser Lösung auf die Kulturschalen gegeben und 30 Minuten im Kulturschrank belassen.

Anschließend folgte das Waschen der Kulturoberfläche mit PBS, danach wurden die PC-12-Zellen ausplattiert. Als ideale Konzentrationen zur Transfektion bzw. Induktion von nicht differenzierten Zellen am nächsten Tag hat sich eine Zellmenge von $2,2 \times 10^5$ Zellen/cm² erwiesen. Für Versuche in denen die PC-12-Zellen differenziert verwendet wurden war eine niedrigere Zellzahl pro cm² notwendig [2.2.10.4]. PC-12-Zellen wachsen unter den üblichen Kulturbedingungen [Tabelle 2-2] in DMEM-Medium mit 10% Pferdeserum und 5% fötalem Kälberserum (FKS) sowie 1% Penicillin/Streptomycin zur Verhinderung von Kontaminationen.

2.2.10.1.2 HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wuchsen nur schwach adhärent, so dass eine Trypsinierung nicht notwendig war. Die Kultivierung erfolgte [Tabelle 2-2] mit DMEM, 10% FKS und Penicillin/Streptomycin-Zusatz.

2.2.10.1.3 CaCo-2-Zellen

CaCo-2-Zellen wurden nie bis zur 100 % Konfluenz gewachsen, da sie dann sehr schwierig abzulösen sind und im Folgenden langsamer wachsen. CaCo-2-Zellen wurden kultiviert [Tabelle 2-2] in DMEM Medium mit 20% FKS und mit Penicillin/Streptomycin-Zusatz. Zur Passagierung war Trypsin erforderlich, da die Zellen stark adhärerten. Eine Differenzierung der Zellen war möglich [2.2.10.4].

2.2.10.1.4 Lan-1-Zellen

Lan-1-Zellen waren morphologisch den HEK293-Zellen sehr ähnlich. Auch adhärerten die Zellen nur schwach an die Kulturoberfläche, auf Trypsin konnte jedoch nicht verzichtet werden. Die Einwirkzeit von Trypsin war mit ca. 1 Minute im Vergleich zu anderen Zelllinien sehr kurz. Als geeignetes Kulturmedium [Tabelle 2-2] erwies sich RPMI Medium mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin.

Tabelle 2-2 Kulturbedingungen

	CaCo-2	PC-12	HEK293	Lan-1
DMEM	x	x	x	
RPMI				x
Fötale Kälberserum (v/v)	20%	5 %	10 %	10 %
Pferdeserum (v/v)		10 %		
Pen/Strep (v/v)	1%	1%	1%	1%
(100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin				
Zellzahl für die Kultivierung/75 cm ²	1,9 x 10 ⁶	5,1 x 10 ⁶	1,35 x 10 ⁵	2,5 x 10 ⁶
Passagieren	2x/Woche	2x/Woche	2x/Woche	2x/Woche
Trysinierung erforderlich	ja			ja
Teilungsverhältnis	1 : 5	1 : 3	1 : 10	1 : 5
Herkunft	Human	Ratte	Human	Human

Tabelle 2-3 verwendete Substanzen für den Induktionsversuch

Substanz	Stoffgruppe	Stammlsg. mM	Lösungsmittel	Lagerung °C	Endkonz. µM	Referenz
Dexamethason kristallin	Glukokortikoid	1,0	Ethanol 96 %	-20	0,1 - 20	[65]
Tropisetron, Navoban®	5-HT ₃ -Antagonist	3,5	-	-20	1	
mCPBG	5-HT ₃ -Agonist	1,0	H ₂ O	-80	1	[66, 67]
17-alpha-Ethynylestradiol	Östrogen	0,1	Ethanol 96 %	-80	0,002	[68]
Interleukin-1-beta	Zytokin	1,0	H ₂ O	-80	1	[69]

2.2.10.2 Revitalisieren von Zellen

Nach schnellem Auftauen der Zellen wurden diese mit 10 ml des entsprechenden Mediums verdünnt und in einem 15 ml Röhrchen bei 300 x g, 3 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zellsediment wurde mit 5 ml Kulturmedium resuspendiert und in 25 cm² Kulturflaschen kultiviert. Ein Wechsel des Mediums wurde am folgenden Tag vorgenommen. Zur weiteren Kultivierung wurden 75 cm² Kulturflaschen verwendet.

2.2.10.3 Einfrieren von Zellen

Von möglichst frühen Passagen der Kulturen wurden Kryokulturen angelegt. Nach Ablösen der konfluenten Zellen von der Kulturflasche wurde die Zellsuspension bei 300 x g, 3 Minuten zentrifugiert. Das Zellsediment einer 75 cm² Kulturflasche wurde mit 8 ml eiskaltem Einfriermedium (90% FKS, 10% DMSO) aufgenommen, in 4 Kryo-Röhrchen aliquotiert und sofort eine Stunde in Eis gekühlt. Darauf folgte eine 3- bis 10-tägige Lagerung bei -80°C und danach die Endlagerung in flüssigem Stickstoff.

2.2.10.4 Differenzierung von Zellen

Von den verwendeten Zelllinien lassen sich die CaCo-2 und die PC-12-Zellen ausdifferenzieren.

2.2.10.4.1 Differenzierung von CaCo-2-Zellen

CaCo-2-Zellen differenzierten durch 14-tägige Kultivierung gezählt ab 100% Konfluenz (Mediumwechsel nach Bedarf).

2.2.10.4.2 Differenzierung von PC-12-Zellen

Die Differenzierung der PC-12-Zellen erfolgte durch Kultivierung mit Nerven-Wachstumsfaktor (NGF) (Stammlösung 0,1 mg NGF gelöst in 10 ml (DMEM +10% FKS) in 1 ml Aliquots eingefroren bei -20°C, d.h. die Konzentration der Stammlösung betrug 10 µg/ml) in einer Endkonzentration von 100 ng/ml [70]. Dieses Differenzierungsmedium sei im Kühlschrank maximal 4 Wochen stabil lagerungsfähig. Es wurde jedoch immer direkt vor dem Mediumwechsel frisch aufgetautes NGF dem Medium zugesetzt. Die Aussaatdichte der Zellen war im Falle der Differenzierung niedriger mit 1×10^5 Zellen pro cm² für 3-tägige Differenzierung und 4×10^4 Zellen pro cm² für 6- bis 9-tägige Differenzierung. Eine Kultivierung mit Differenzierungsmedium wurde für mindestens 3 Tage vorgenommen.

2.2.10.5 Transfektion

Die Zellen wurden 12-18 h vor der Transfektion in der in Tabelle 2-4 angegebender Dichte ausgesät. Die Transfektion wurde nach Angaben der Hersteller der verwendeten Transfektionsreagenzien vorgenommen [Tabelle 2-4]. Nach 12-18 h wurde das Kulturmedium ausgetauscht, nach 48 h wurden die Zellen geerntet. Verwendet wurde der Lysepuffer aus dem *Dual-Luciferase® Reporter Assay Kit* [2.2.10.6].

Tabelle 2-4 Transfektionsbedingungen

	CaCo-2	PC-12	HEK 293	Lan 1
Transfektionsreagenz	Fugene	Lipofektamine	Fugene	Fugene
Transfektionsreagenz:DNA ($\mu\text{l}:\mu\text{g}$)	3 : 1	10 : 4	3 : 1	3 : 2
Zelldichte für Transfektion (Zellen pro cm^2)	$4,2 \times 10^4$	nativ: $2,2 \times 10^5$ differenziert s. 2.2.10.4	2×10^5	6×10^4
Menge DNA für $9,6 \text{ cm}^2$	1 μg	4 μg	1 μg	2 μg
Transfektionsvolumen $9,6 \text{ cm}^2$	1 ml	2 ml	1 ml	1 ml
Transfektionsvolumen $3,5 \text{ cm}^2$	0,5 ml	1 ml	0,5 ml	0,5 ml

2.2.10.6 Quantitative Luciferase-Messung

Es wurde das *Dual-Luciferase® Reporter Assay Kit* zur Messung der entstandenen Luziferasemessung verwendet. Es beruht auf der Messung von Licht, dass entsteht wenn das Substrat Luziferin durch Luziferase zu Oxyluziferin und Lumineszens umgesetzt wird. Die Zelllinien PC-12, HEK293 und Lan-1 wurden mit dem Lysepuffer von der Kulturoberfläche gelöst, während bei den CaCo-2-Zellen zum Abkratzen der Zellschicht ein „Rubber-Policeman“ verwendet wurde. Die komplette Lyse der Zellen wurde durch 2-maliges Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen bei Raumtempertur sichergestellt. Darauf folgte ein 3 Minuten dauernder Zentrifugationsschritt bei maximaler Geschwindigkeit in der Biofuge fresco. Entgegen der Vorgaben des Herstellers wurden nur 16 μl des Zelllysates mit je 80 μl Luziferin und Stop & Glow Lösung aus dem *Dual-Luciferase® Reporter Assay Kit* versetzt. Die Messung fand im Tecan Ultra oder im GloMax® statt. In allen Luziferaseuntersuchungen wurde das pRL_CMV_Renilla-Plasmid ko-transfiziert, um Schwankungen in der Transfektionseffizienz zu nivellieren. In allen Fällen wurde als Positivkontrolle für das Transfektionsprocedere und die anschließende Luziferasemessung ein Plasmid mit definiertem starkem Promotor in einer separaten Kavität transfiziert und vermessen.

2.2.11 Arbeiten mit RNA

2.2.11.1 Isolation von RNA

Die Isolierung der RNA wurde mit dem RNeasy-Mini-Kit von Qiagen durchgeführt. Es wurden nie mehr als 5×10^6 Zellen geerntet. Diese wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit 350 μl 2-Mercaptoethanol-haltigem RLT Puffer (aus dem RNeasy-Mini-Kit)

lysiert. Dieses Lysat wurde entweder für maximal eine Woche bei -80°C eingefroren oder sofort laut Anweisung aufgearbeitet. Entgegen den Vorschlägen des Herstellers wurden alle Zentrifugationsschritte zur Vereinfachung bei maximaler Geschwindigkeit eine Minute in der Biofuge pico durchgeführt. Zur Elution der RNA wurden 30 µl RNase-freies Wasser verwendet. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch in TE-Puffer ermittelt. Es wurde bei der Wellenlänge von 260 nm die Extrinktion bestimmt und daraus die Konzentration berechnet (E_{260} von 1 entspricht 40 µg RNA/ml). Wenn anschließend mit der RNA ein 5'RACE durchgeführt wurde und wenn die Qualität von RNA aus Gewebe nicht genau bekannt war erfolgte eine zusätzliche Qualitätsbestimmung mit dem RNA 6000 Nano LabChip Kit.

2.2.11.2 Arbeiten mit und Aufbewahrung der RNA

Während des Arbeitens wurde die RNA grundsätzlich auf Eis gelagert. Vor dem Arbeiten wurden alle Flächen mit RNase Zap Spray besprüht. Es wurden ausschließlich RNase-freie Gefäße und Pipettenspitzen verwendet. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

2.2.11.3 cDNA Synthese

Die reverse Transkription der RNA zu *copy* oder *complementary DNA* (cDNA) wurde mit *Super Script II* Reverser-Transkriptase durchgeführt. Dazu wurden 1 µg RNA ad 12,5 µl mit Wasser verdünnt und 0,1 Einheiten *Random Hexamer (dN6) Primer* zugegeben. Der Ansatz wurde für 10 Minuten auf 70°C erhitzt ohne zu schütteln, um die RNA zu denaturieren. Danach wurden 10 Minuten Abkühlen bei Raumtemperatur abgewartet, um die Anlagerung der Primer zu gewährleisten und daran anschließend 16,5 µl RT-Mastermix zugefügt. Nach der Inkubation bei 42°C für eine Stunde war die reverse Transkription beendet. Der Ansatz wurde mit 70 µl Wasser verdünnt auf eine Endkonzentration von 10 ng/µl. Die Aufbewahrung der cDNA erfolgte bei -80°C

RT-Mastermix (für 1 µg RNA)

5x Superskript RT Puffer	6,00 µl
0,1 M DTT	3,50 µl
10 mM dNTPs	1,00 µl
RNase Inhibitor (30 U/µl)	1,50 µl
Reverse Transkriptase (200 U/µl)	0,25 µl

2.2.12 Genexpressionsmessungen mit qRT-PCR

Alle Echtzeit-PCR-Untersuchungen (im Folgenden als qRT-PCR bezeichnet) wurden mit dem TaqMan 7900HT durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 25 µl in 96er Platten (ABgene) oder 18 µl in 384er Platten (ABgene). Es wurde der *qPCR® Core Kit* bzw der *qPCR® Core Kit for SYBR® Green* verwendet. Das Prinzip der Echtzeitmessung im TaqMan ist, dass man den exponentiellen Anstieg an PCR-Produkt mit steigenden Zykluszahlen mitverfolgen kann. Je mehr cDNA Moleküle als Matrize zum Zeitpunkt null zur Verfügung standen, desto früher detektiert das Gerät ein Signal. Der Vergleich der Kurven ermöglicht die Berechnung der ursprünglichen Menge an cDNA Molekülen vor dem ersten Zyklus. Eine Methode der Detektion ist mittels SYBR Green, das in doppelsträngige DNA interkaliert. Die PCR-Produkte aller SYBR Green PCRs wurden kontrolliert durch eine direkt im Anschluß an die PCR durchgeführte Schmelzkurve, die eine Aussage über die Spezifität der PCR macht. Eine weitere Möglichkeit bieten DNA-Sonden, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. In dieser Arbeit wurden Sonden der Firma Applied Biosystems verwendet, die mit VIC oder FAM und einem nichtfluoreszierenden Quencher versehen waren. Um eine festere Anlagerung der Sonden zu gewährleisten versieht die Firma ihre Sonden mit einem Molekül, das sich in die kleine Furche der DNA lagert. cDNA aus menschlicher RNA wurde mit den Expressionswerten für das TATA-box-bindende-Protein normalisiert (4310891E), die cDNA aus Ratten-RNA wurde mit den Expressionswerten für humane 18S rRNA (Hs99999901_s1) normalisiert. Für alle Genexpressionsmessungen an Rattenzellen wurde 18S als Vergleichsgen verwendet. Die Sequenz des amplifizierten Bereiches des humanen-18S-Assays war zu 100% identisch im Genom des Menschen verglichen mit dem Genom der Ratte. In den Gewebeexpressionsversuchen wurde RNA aus menschlichem Gehirn, Dünndarm, Dickdarm und Niere (RNA aus Gewebe von verschiedenen gesunden Menschen wurden vereinigt) sowie RNA aus den Gehirnbereichen der *Amygdala*, der *Pons*, dem *Hypothalamus*, *Nucleus caudatus*, der *Medulla oblongata* und dem *Hippocampus* verwendet. Alle Proben stammten aus post mortem Isolaten von Personen, die bei einem Unfall oder an einer Krankheit gestorben waren, die keinen Effekt auf die Genexpression der untersuchten Organe gehabt haben sollte. RNA aus der Zellkultur wurde mit dem RNeasy Kit isoliert [2.2.11.1].

Einige menschliche Zelllinien wurden auf ihre HTR3B-Expression mittels qRT-PCR untersucht wie in Abschnitt 3.1.2 dargestellt. Dabei wurden die Neuroblastom-Zelllinien in Duplikaten gemessen, alle anderen Zelllinien in Triplikaten mit Wiederholungen. Die HTR3B-Expression wurde berechnet und angegeben in HTR3B-Transkripten / 100 TBP-

Transkripten. Die TBP-Schwellen-Zykluswerte der PCRs lag in allen diesen Zelllinien im Bereich zwischen dem 23. und 25. PCR-Zyklus. Der durchschnittliche PCR-Zykluswert für HTR3B in dCaCo-2 lag bei 31 Zyklen.

Die Zusammensetzung des benutzten 2xMastermixes der Firma Eurogentec war folgende:

2x Mastermix (Eurogentec)

10-fach Puffer	2,5	µl
MgCl ₂ (50 mM)	2,0	µl
dNTPs (5 mM)	1,0	µl
Hot Goldstar Polymerase (5 U/µl)	0,12	µl
ddH ₂ O	6,88	µl

2.2.12.1 Genexpressionsmessung mit SYBR Green

Primer für Rattensequenz	5' – 3' Sequenz
Ratte_mRNA_F2	TCT CTC CCT CTC AGT GCC ATC T
Ratte_mRNA_R2	GTG GTT TCT AAT CGT TCC GGA A

Mastermix für 18 µl Volumen

2 x Mastermix	9,0	µl
Primer f (100 mM)	0,16	µl
Primer r (100 mM)	0,16	µl
SYBR Green	0,59	µl
ddH ₂ O	5,09	µl
cDNA (10 ng/µl)	3,0	µl

PCR-Bedingungen

Stufe	Temperatur	Zeit	
Taq-Polymerase	95 °C	10 min	
Aktivierung			
Denaturierung	95 °C	15 s	40x
Annealing	65 °C	30 s	
Elongation	72 °C	1 min	
	95 °C	15 s	
Dissoziationskurve	60 °C	15 s	
	95 °C	15 s	

2.2.12.2 Genexpressionsmessung mit genspezifischen Sonden

Genexpressions-Assays, Applied Biosystems

Gen	Assay-No.
HTR3A (auch für die Ratte verwendet)	Hs00168375_m1
HTR3B	Hs00175775_m1
18S	Hs99999901_s1

PCR-Bedingungen

Taq-Polymerase	95 °C	10 min	39-49 Zyklen
Aktivierung			
Denaturierung	95 °C	15 s	
Annealing	60 °C	1 min	

2.2.12.3 Relative Quantifizierung

Wenn die Transkriptmenge von Proben relativ zueinander bestimmt werden sollte, so wurde die Expression relativ zu einer ausgewählten Kontroll-Probe ausgedrückt. Es wurden jeweils Doppel- oder Dreifachmessungen durchgeführt. Für die Berechnung wurde zunächst der Mittelwert der Kontrollprobe für den Zykluswert bei dem der PCR-Produkt-Schwellenwert erreicht wurde, sowie der Mittelwert für diese Proben aus den Einzelmessungen für das

Normalisierungsgen (NGen) bestimmt. Diese Mittelwerte wurden in die unten angegebene Formel eingesetzt und damit für die Einzelwerte aller Messungen die relative Genexpression bestimmt. Aus den sich ergebenden Werten wurden für die Mehrfachmessungen Mittelwerte und die Standardabweichung bestimmt und graphisch dargestellt.

Formel für die Berechnung der relativen Genexpression:

$\text{rel. Expression} = 2^{-[(Ct - Ct_{\text{NGen}}) - (Ct_{\text{MittelwertKontrolle}} - Ct_{\text{Mittelwert NGen Kontrolle}})]}$

2.2.12.4 Absolute Quantifizierung

Um eine Aussage über absolute Transkriptmengen des betrachteten Gens in der Probe zu machen, wurde für HTR3A das Referenzplasmid IRAUp969C022D6 verwendet für HTR3B der zuvor beschriebene cDNA Klon [2.2.8.6]. Der HTR3A-Klon wurde in Chloramphenicol-haltigem Medium der für HTR3B in Kanamycin-haltigem Medium vermehrt und anschließend extrahiert. Nach photometrischer Gehaltsbestimmung wurde unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes der Konstrukte die Menge an Plasmiden pro μl berechnet. Es wurden Verdünnungen mit bekanntem Plasmidgehalt hergestellt, die im Messbereich der Proben lagen. Die Verdünnungen wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert, so dass sie jederzeit als Standardlösung zur Verfügung standen. Die Standardkurve wurde auf jeder Probenplatte erneut erstellt, so dass Schwankungen in der PCR das Ergebnis nicht beeinflussen konnten.

2.2.12.5 qRT-PCR zur Diskriminierung der mRNA Transkripte

Zur Verifizierung der unterschiedlichen Transkriptionsstartpunkte im Gehirn, Dünndarm und Dickdarm wurde eine diskriminierende Echtzeit-PCR durchgeführt. Es wurde eine PCR durchgeführt, die das Produkt E1a mit den Primern E1a_f und E1a_r bildeten. Des Weiteren generierte die PCR mit den Primern E1b_f und E1b_r das Produkt E1b und eine Kontroll-PCR-Reaktion mit den Primern E2/3_f und E1b_r wurde etabliert, die alle insgesamt möglichen Transkripte erfasste [Abbildung 18]. In allen Fällen wurde das *SYBRGreen qPCR Core Kit* nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Bedingungen für die PCR im TaqMan 7900HT waren: 95°C für 10 Minuten, dann 40 Zyklen mit 58°C für 15 Sekunden und 72°C

für 1 Minute. Im Anschluss daran fand eine Schmelzpunktanalyse statt, die als Kontrolle für SYBRGreen Analysen verwendet wird und die in allen Fällen den Erfolg der PCRs bestätigte. Um Schwankungen in der reversen Transkription der mRNAs auszuschließen, wurden alle gemessenen cDNAs zusätzlich auf ihren Gehalt an TATA-box bindenden Proteinen (TBP) vermessen. So konnten die Ergebnisse als Transkriptmenge des entsprechenden Transkriptes pro 100 Transkripte TBP normalisiert werden.

2.2.13 Elektrophoretic Mobility Shift Assay

Der Elektrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) dient zur Untersuchung von DNA-Protein-Bindungen. Es wurde ein Zellkernproteinextrakt mit einer radioaktiv markierten Gensonde inkubiert. In der darauffolgenden Elektrophorese in nativem Polyakrylamidgel wurden alle Proteine des Zellkernextraktes nach ihrer Größe und Ladung aufgetrennt. Sollten native Proteine aus dem Extrakt an die Gensonde gebunden haben, so wandern diese verzögert („geshiftet“) im Gel. Die Banden werden durch die radioaktive Markierung sichtbar gemacht. In dieser Arbeit wurde diese Methode unter Verwendung von Zellkernproteinextrakten von HEK293-Zellen und von PC-12-Zellen eingesetzt. Die Zellkernextrakte wurden wie unter [2.2.13.6] beschrieben hergestellt, und bei -80°C gelagert und danach maximal einmal, bei HEK-Zellkernproteinextrakt zum Teil auch zweimal, aufgetaut. Sowohl bei der Herstellung als auch bei der Verwendung im Gelshiftversuch wurden die Zellkernextrakte stets auf Eis gekühlt bis sie auf das Gel aufgetragen wurden. Es wurden 5% Polyakrylamidgele verwendet. Als Laufpuffer diente 0,5% TBE Puffer. Die Gelkammer (RUBY_SE600) wurde nicht gekühlt. Es wurde eine Sonde aus der Sequenz des *cAMP-responding-Elements* (CRE) als Kontrolle verwendet [71].

2.2.13.1 alpha-³²P-markierte Sonden

2.2.13.1.1 Zusammenlagerung der komplementären Oligonukleotide

Von den bis auf die Enden komplementären Einzelstrang-Oligonukleotiden wurden je 100 pmol mit 0,5 µmol NaCl ad 50 µl mit ddH₂O verdünnt. Dieser Ansatz wurde in ~95°C heißes Wasser gestellt und über Nacht stehen gelassen. Um ein langsames Abkühlen zu gewährleisten wurde dieses Abkühlen in einem Eisbehälter aus geschäumtem PVC mit einem fast aufliegenden Deckel durchgeführt. Durch dieses Verfahren lagerten sich die Einzelstrang-Oligonukleotide zu doppelsträngigen DNA-Stücken zusammen.

Tabelle 2-5 Oligonukleotide für EMSA

Oligonukleotide	5' – 3' Sequenz	Referenz
„Ets-1/Pea3“	#sc2555 und #sc2556	SCB, USA
„Ets-family gel shift“	#sc2549 und sc#2550	SCB, USA
c-myb_mim1_as	GAT CGC GCT AAA AAA CCG TTA TAA TGC	[72]
c-Myb_mim1_s	GAT CGC ATT ATA ACG GTT TTT TAG CGC	
c-Myc_RCC1_s2 (symmetrisch)	GAT CTT TTT CAC GTG AAA AAA	TRANSFAC
CRE_r	TAC TCT CTC TCT GAC GTC AGC CAA GGA	[71]
CRE2_f	ACT GGT CCT TGG CTG ACG TCA GAG AGA GAG	
GR_cons_as	GAT CAA GAA CAG ATT GTA CCA	TRANSFAC
GR_cons_s	GAT CTG GTA CAA TCT GTT CTT	
GS_5HT3b_Del_as	CAC TCT GTT CTC CTC CTC CGT TTG	
GS_5HT3B_Del_as_verk	TTC TCC TCC TCC GTT TG	
GS_5HT3b_Del_s	AAC TGG CAA ACG GAG GAG GAG AAC AGA GTG	
GS_5HT3B_Del_s_verk	AAC TGG CAA ACG GAG GAG GAG AA	
GS_5HT3b_Ins_as	CAC TCT GTT CTC CTC CTT CTC CGT TTG	
GS_5HT3B_Ins_as_verk	TTC TCC TCC TTC TCC GTT TG	
GS_5HT3b_Ins_s	AAC TGG CAA ACG GAG AAG GAG GAG AAC AGA GTG	
GS_5HT3B_Ins_s_verk	AAC TGG CAA ACG GAG AAG GAG GAG AA	
GS_rs3758987_as_var_5HT3b	CCT TTA CCT AAG GCA GTG CTC TTG CTG ACA TT	
GS_rs3758987_as_wt_5HT3b	CCT TTA CCT AAG GCA GTA CTC TTG CTG ACA TT	
GS_rs3758987_s_var_5HT3b	GTC CTG AAT GTC AG AAG AGC ACT GCC TTA GGT AAA GG	
GS_rs3758987_s_wt_5HT3b	GTC CTG AAT GTC AGC AAG AGT ACT GCC TTA GGT AAA GG	
Ins_d1	AAC TGG ACG GAG AAG GAG GAG AA	
Ins_d1_r	TTC TCC TCC TTC TCC GT	
Ins_d2	AAC TGG CAA GAG AAG GAG GAG AA	
Ins_d2_r	TTC TCC TCC TTC TCT TG	
Ins_d3	AAC TGG CAA ACG AAG GAG GAG AA	
Ins_d3_r	TTC TCC TCC TTC GTT TG	
Ins_d5	AAC TGG CAA ACG GAG AAG GAG AA	
Ins_d5_r	TTC TCC TTC TCC GTT TG	
Ins_d6	AAC TGG CAA ACG GAG AAG GAG GA	
Ins_d6_r	TCC TCC TTC TCC GTT TG	
PR_hGH_as	GAT CCC CCT CAG GAC ACA TTG TGC CCA AAG G	[73]
PR_hGH_s	GAT CCC TTT GGG CAC AAT GTG TCC TGA GGG G	
PU.1_p47phox_as	GAT CGC ACT GGA AAG AGG AAG TCG CTT TG	[74]
PU.1_p47phox_s	GAT CCA AAA GCG ACT TCC TCT TTC CAG TGC	

2.2.13.1.2 Radioaktive Markierung der doppelsträngigen Oligonukleotide

Die doppelsträngigen Oligonukleotide wurden so konstruiert, dass bei Auffüllen der überhängenden Enden mit Klenow-Fragment mindestens ein mit α - ^{32}P radioaktiv markiertes

dCTP eingebaut wurde. Auf diese Weise wurden die doppelsträngigen Oligonukleotide zu radioaktiven Sonden für den Gelshift.

Im Isotopenlabor wurden vor Beginn der Markierung saugfähige Unterlagen ausgebreitet und sterile Pipettenspitzen sowie ein Abfallbehälter zurechtgestellt. Vor dem Betreten des „heißen“ Bereiches wurden die ds-Oligonukleotide mit dNTPs (A, G, T), dem 10 x Klenow-Puffer und ddH₂O auf Eis gemischt. Im radioaktiven Bereich wurden anschließend α -³²P-dCTP und Klenow-Fragment zugegeben.

Für einen 20 μ l Ansatz:

ds-Oligonukleotide (2 pmol/ μ l)	1 μ l
dNTPs (A, G, T je 1 mM)	1 μ l
10 x Klenow-Puffer	2 μ l
ddH ₂ O	12 μ l
α - ³² P-dCTP (10 μ Ci/ μ l)	2 μ l
Klenow-Fragment (1 U/ μ l)	2 μ l

Die Inkubationszeit betrug 1 h bei Raumtemperatur.

2.2.13.1.3 *Reinigung der Sonden*

Die Reinigung der markierten Oligonukleotide von nicht verwendeten nicht radioaktiven (kalten) und radioaktiven dNTPs erfolgte unter Verwendung von *Mini Quick Spin Oligo Columns*. Die Sephadexmatrix der Säulen wurden, entgegen der Anweisung des Herstellers, nur durch über Kopf drehen und Anschnipsen homogenisiert. Nach einer Zentrifugation bei 3200 x g für eine Minute bei Raumtemperatur wurde der radioaktive Ansatz auf die Mitte der Säule gegeben. Die Säule wurde in einem neuen 1,5 ml Reaktionsgefäß erneut bei 3200 x g für 4 Minuten zentrifugiert. Das Eluat enthielt die gereinigte Sonde.

2.2.13.1.4 *Quantitative Bestimmung der Radioaktivität*

Zur quantitativen Bestimmung der Radioaktivität wurden 4 ml Szintillationslösung vorgelegt und darin 1 μ l der Sonde im Szintillationsmessgerät LS5000TD vermessen. Die Sonde wurde mit ddH₂O annähernd auf eine Konzentration von 15 000 cpm pro μ l verdünnt. Im Versuch wurde dann die Menge Sonde pipettiert, die laut Messung genau einer Radioaktivität von 30 000 cpm entsprach.

2.2.13.2 Bindungsreaktion

Während die Zellkernextrakte auftauten, wurden die Geltaschen des 5% Polyakrylamidgels in der Elektrophoresekammer mit 0,5% TBE ausgespült und das Gel für 30 Minuten bis zu einer Stunde bei 180 V (mA maximal) angestellt [Herstellung des Gels 2.2.13.3].

Alle Pipettierschritte und Inkubationen wurden auf Eis durchgeführt. Für die Bindungsreaktion wurde ein 4-facher Bindungspuffer angesetzt. Bei der Präparation der Komponenten war zu beachten, dass der pH-Wert von Hepes auf pH 7,9 bei 4°C eingestellt wurden und die Lösung anschließend bei 4°C gelagert werden musste.

4 x Bindungspuffer

Hepes (pH 7,8)	80 mM
EDTA (pH 8)	300 mM
DTT	2 mM
Glycerin	40 %
KCl	560 mM

Bindungsreaktion

4 x Bindungspuffer	5 µl
Zellkernproteinextrakt	20 µg
Poly dI-dC	2 µg
ddH ₂ O	ad 18 µl

Die Zugabe von Poly dI-dC verringert unspezifische DNA-Bindungen. Der Bindungsreaktionsansatz wurde 10 Minuten auf Eis inkubiert. Darauf erfolgte die Zugabe von 30 000 cpm der jeweiligen Sonde [Tabelle 2-5]. Erneute Inkubation auf Eis für 15 Minuten wurde angeschlossen. Danach wurden 4 µl des 6 x Ladungspuffers zugegeben.

6 x Ladungspuffer

Lagerung bei -20 °C	Glycerin 87 %	30 % (v/v)
	Bromphenol Blau	0,25 % (w/v)
	Xylen Cyanol FF	0,25 % (w/v)

2.2.13.3 Nicht-denaturierende Gelelektrophorese

Das Gel lief bei 180 V für ca. 1,5 h mit 0,5% TBE-Puffer. Danach wurde es auf 2 Blotting-Papiere transferiert und mit Frischhaltefolie überdeckt. Es folgte die Trocknung auf dem Gelrockner (1,5 h bis 2 h). Um die Banden sichtbar zu machen wurde das getrocknete Gel über Nacht auf eine Fujifilm BAS1500-Platte gelegt und dann im Imager ausgelesen. In manchen Fällen lohnte sich die Belichtung eines Röntgenfilms (Hyperfilm^{TMECL}), bei -80°C über 7 – 10 Tage mit anschließender Entwicklung.

5 % Polyakrylamidgel

Akrylamidlösung 40 % (w/v)	6,25 ml
5 x TBE	5,00 ml
ddH ₂ O	38,50 ml
APS 10 % (w/v)	0,50 ml
TEMED	50 µl

0,5 % TBE pH 8

Tris	45 mM
Borsäure	45 mM
EDTA	1 mM

2.2.13.4 Kompetition im EMSA

Die Kompetition der radioaktiven Sonde mit nicht markierter Sonde um die Bindungsstelle am Protein diente zum Ausschluss von unspezifischen Bindungen und damit unspezifischen Banden im EMSA. Dazu wurde noch außerhalb des Isotopenbereiches das nicht markierte doppelsträngige Oligonukleotid in den Konzentrationen 30-fach, 100-fach, 300-fach und 1000-fach dem Reaktionsansatz zugegeben. Man ging davon aus, dass die Zugabe eines komplett anderen doppelsträngigen Oligonukleotides die Bindung der radioaktiven Sonde am Protein nicht beeinflusst, maximal in extrem hoher Zugabe die Bindung der Sonde am Protein sterisch hemmt. Die Zugabe von kalter Sonde sollte jedoch die Bindung der heißen Sonde je nach Molekülverhältnis verdrängen.

2.2.13.5 Quantitative Auswertung der Gelshiftbilder

Die entwickelten Filme wurden eingescannt und im jpg-Format gespeichert. Ebenso wurden die TINA-Dateien von den Fujiplatten auch im jpg-Format gespeichert. Anschließend wurden die Dateien im Programm *Quantity one* geöffnet und die Banden quantitativ nach Pixelanzahl ausgelesen. Die Auswertung erfolgte mit Excel.

2.2.13.6 Zellkernproteinisolierung

Die Zellkernproteinextraktion erfolgte in einer modifizierten Form nach Dignam [75]. Bei dieser Methode werden zunächst die Zellkerne vom Rest der Zelle getrennt und anschließend die Proteine der Kerne isoliert. Es gilt darauf zu achten, dass alle pH-Werte genau eingestellt sind, da native Proteine leicht denaturieren. Alle verwendeten Lösungen mussten eiskalt sein. Die für diese Arbeit verwendeten Zellkernproteinextrakte waren aus HEK293-Zellen und PC-12-Zellen präpariert.

2.2.13.6.1 Zellkerne isolieren

Die kultivierten Zellen von 10 Kulturschalen mit einem Durchmesser von 15 cm je Zelllinie wurden verwendet, das Medium abgesaugt und die Zellen nach Abkratzen mit 7 ml PBS in vorgekühlte 50 ml Röhrchen überführt, wobei die Zellen von 5 Platten jeweils in einem Röhrchen gesammelt wurden. Die Platten wurden mit je 3 ml PBS nachgespült. Es bleiben 2 Röhrchen mit je 50 ml Zellsuspension zur Zentrifugation. Der erste Zentrifugationsschritt fand in der auf 4°C gekühlten Laborfuge 400R bei 900 x g für 10 Minuten statt. Der Überstand wurde abgesaugt. Es wurde jeweils mit 4,5 ml Puffer A [Tabelle 2-6] resuspendiert und in ein 50 ml Röhrchen zusammengeführt. Nach einer 10 Minuten dauernden Quellung der Zellen auf Eis folgte eine erneute Zentrifugation bei 4°C für 10 Minuten bei 900 x g. Das Pellet wurde mit 1,8 ml Puffer A aufgenommen und die Zellen im gekühlten Glashomogenisator (B-Typ Pistill) mit 18 Hüben zerstört. Die Zellkerne bleiben bei diesem Schritt intakt. Anschließend wurde das Zelllysate in ein gekühltes Beckman Zentrifugenröhrchen (50 ml) überführt und bei 4°C für 10 Minuten bei 3000 x g zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes und erneutem Aufnehmen des Sedimentes in 1,8 ml Puffer A wurden die Zellkerne bei 4°C für 20 Minuten bei 14 500 x g dieses Mal in der Beckmanzentrifuge (Beckman JA-20 Rotor) sedimentiert. Der Überstand mit den restlichen zytosolischen Verunreinigungen wurde abgesaugt.

2.2.13.6.2 Zellproteine aus den Kernen gewinnen

Die groben Kernextrakte wurden in 1 ml Puffer C [Tabelle 2-7] aufgenommen und in den Glashomogenisator Typ-B überführt. Durch 10 Hübe wurden die Zellkerne zerstört. Der Ansatz wurde in das Beckman-Zentrifugenröhrchen gegeben und liegend in Eis im 4°C Kühlraum auf dem Plattformschüttler geschaukelt. Durch anschließende Zentrifugation bei 14 500 x g für 30 Minuten bei 4°C in der Beckmanzentrifuge wurden die Kernproteine im Überstand gereinigt. Der klare Überstand wurde in ein kleines Becherglas mit Magnetrührer überführt. Durch die langsame Zugabe (ca. 30 Minuten) von 0,33g Ammoniumsulfat-Kristallen im 4°C Kühlraum wurden die Proteine gefällt. Bei dieser Zugabe wurde darauf geachtet, dass der Experimentator mit ausreichend warmen Kleidungsschichten ausgestattet war, um Erkältungen vorzubeugen. Nach dem Lösen der letzten Kristalle wurde das Becherglas mit Parafilm verschlossen und der Rührvorgang bei 4°C weitere 30 Minuten fortgesetzt. Die trübe Flüssigkeit wurde in ein vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und die gefällten Proteine bei 4°C in der Biofuge fresco bei maximaler Geschwindigkeit über 20 Minuten sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Proteinpellet wurde mit 500 µl eiskaltem sterilfiltriertem Puffer D [Tabelle 2-8] aufgenommen.

2.2.13.6.3 Dialyse der Kernproteine

Die Kernproteine wurden durch Dialyse von Salzen gereinigt. Dazu wurde ein ca. 30 cm langes Stück Dialyseschlauch (Dialysis Tubing, Sigma) in destilliertem Wasser eingeweicht und durchgespült. Durch anschließendes Aufkochen und langsames Abkühlen via Zugabe von kaltem Wasser, gefolgt von erneutem Aufkochen in neuem destillierten Wasser und Stehenlassen wurde der Schlauch rekonstituiert. Kurz vor Gebrauch wurde der Schlauch mit Wasser durchspült und ausgeschlagen. Danach wurde er sofort mit dem Proteinextrakt gefüllt. Es eigneten sich am besten Pasteurpipetten, die auf eine elektrische Pipettierhilfe aufgesteckt wurden. Der Schlauch wurde mit etwas Druck befüllt und auf jeder Seite mit einem Knoten und einer Schlauchklemme verschlossen. Sodann wurde der Schlauch an einer 10 ml Pipette aus der Zellkultur mit Tesafilm angeklebt und in ein 1 l Becherglas, das mit 500 ml eiskaltem Puffer D (nicht steril) gefüllt war, hineingestellt. Auf einem Magnetrührer im 4°C Kühlraum wurde bei langsamem Rühren über Nacht dialysiert. Es wurde darauf geachtet, dass sich die Schlauch-Pipetten-Konstruktion nicht mit der Flüssigkeit dreht. Am nächsten Morgen wurde das Dialysat in ein gekühltes Beckman-Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4°C und 14 500 x g für 20 Minuten in der Beckmanzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand enthielt die Zellkernproteine. Nach der Konzentrationsbestimmung des Proteingehaltes (~10 µg/µl

Ausbeute wurden erwartet) wurde der Extrakt in 30 µl Portionen aliquotiert und nach Schockgefrieren bei -80°C gelagert.

2.2.13.6.4 Konzentrationsbestimmung des Proteingehaltes

Der Proteingehalt der Zellkernextrakte wurde mittels *Bio-Rad Protein Assay* durchgeführt. Der Bio-Rad-Farbstoff Coomassie Brilliant blue wurde gefiltert und mit Wasser 1:5 verdünnt. Die Bestimmung wurde in 10x4x45 mm Küvetten durchgeführt. Es wurde eine Eichgerade mit einer BSA-Lösung der Konzentration 1 µg/µl verwendet. Als Messlösung diente 1 ml TE Puffer. Für die Eichgerade wurden 3, 5, 7, 9 und 11 µl BSA-Lösung eingesetzt. Die Zellkernextraktlösung wurde 1:6 verdünnt und dann 4 µl pro Probe eingesetzt. Die Proteinextrakte wurden in 3-facher Messung bestimmt. Nach einer 10 Minuten dauernden Inkubation wurde die Extinktion gemessen. Die Extinktion bei E₅₉₅ wurde gegen die Proteinmenge in µg aufgetragen. Aus der daraus errechneten Geradengleichung konnte die Konzentration bestimmt werden.

Tabelle 2-6 Puffer A steril filtriert pH 7,9 bei 4 °C

Reagenz	Stammlösung	Menge für		Bemerkungen
		600 ml	Endkonzentration	
	M	ml	mM	
HEPES/KOH pH 7,9	1	6,0	10,0	pH bei 4 °C kurz vor Gebrauch zusetzen
MgCl ₂	1	0,9	1,5	
KCl	2	3,0	10,0	
DTT	1	0,3	0,5	
dH ₂ O.		ad 600		

Tabelle 2-7 Puffer C steril filtriert pH 7,9 bei 4 °C

Reagenz	Stammlösung	Menge für		Bemerkungen
		600 ml	Endkonzentration	
	M	ml	mM	
HEPES/KOH	1	1,2	20,0	pH bei 4 °C
Glycerin 85 %		17,6	25 %	
NaCl	2,5	10,0	420,0	
MgCl ₂	1	0,09	1,5	
EDTA	0,1	0,12	0,2	
DTT	1	0,03	0,5	Kurz vor Gebrauch zusetzen
PMSF ³	0,25	0,12	0,5	Kurz vor Gebrauch zusetzen
Aqua dest		ad 60 ml		

Tabelle 2-8 Puffer D pH 7,9 bei 4 °C

Reagenz	Stammlösung	Menge für		Bemerkungen
		600 ml	Endkonzentration	
	M	ml	mM	pH bei 4 °C
Hepes/KOH	1	20,0	20,0	
Glycerin 85 %		234,0	20 %	
KCl	2	50,0	100,0	
EDTA	0,1	2,0	0,2	
DTT	1	0,5	0,5	Kurz vor Gebrauch zusetzen
PMSF	0,25	2,0	0,5	Kurz vor Gebrauch zusetzen
Aqua dest		ad 1000 ml		

³ PMSF wird in Ethanol gelöst, Lagerung bei 4 °C für max 9 Monate

2.3 Bioinformatische Untersuchungen zur genetischen Kopplung

Die bioinformatische Kopplungsanalyse von Genbereichen wurde möglich durch das weltweite *haplotype mapping project* (HapMap-Projekt). Hier wurden Daten der Genotypisierungen von 90 US-amerikanischen Kaukasiern (30 US-Familien nord/west-europäischer Abstammung) im Netz zugänglich gemacht [53]. Unter Verwendung des Programms Haploview wurden Haplotypblöcke mittels der Konfidenzintervallmethode nach Gabriel et al. [76] bestimmt. Die Kriterien für die Blockbildung wurden so verändert, dass statt 95% (StandardEinstellung) 70% aller paarweisen Vergleiche innerhalb der Konfidenzgrenzen lagen. Dadurch wurde die Sensitivität für das Erkennen von Blöcken im interessierenden Bereich erhöht unter Inkaufnahme einer geringeren Spezifität. Die zugelassene Allelhäufigkeit wurde auf 10% begrenzt. In die Bewertung des *linkage disequilibriums* gingen also der D' Wert zwischen zwei Varianten ein, sowie die Konfidenzgrenzen für D' .

$$D = P_{AB} - P_A \times P_B,$$

P_A die Häufigkeit von Variante A für SNP 1

P_B die Häufigkeit von Variante B für SNP 2

P_{AB} ist die Häufigkeit mit der auf einem Allel die Varianten A und B zusammen vorkommen

D' = Entspricht D dividiert durch das Maximum, das D aufgrund der Häufigkeiten von A und B erreichen kann [77]. D' ist somit ein Mass für die Höhe des *linkage disequilibriums*. Bei einem D' von eins (entspricht den Feldern des Diagrams, die keine Zahl enthalten) wird bei paarweisem Vergleich wenigstens einer der 4 möglichen Haplotypen nicht beobachtet.

LOD = Beschreibt den Logarithmus des *Odds Ratios* der *Likelihood* und ist damit ein Messwert für die Sicherheit mit der die Aussage über das *linkage disequilibrium* stimmt (www.broad.mit.edu).

3 Ergebnisse

3.1 Expression von *HTR3A* und *HTR3B*

Die Transkriptzahlen der Gene *HTR3A* und *HTR3B* wurden in verschiedenen Zelllinien und in verschiedenen menschlichen Geweben quantifiziert. Dafür wurden Gewebe ausgesucht, von denen aus der Literatur bekannt war, dass sie 5-HT₃-Rezeptoren exprimieren [35] [32] [39].

3.1.1 Expression in humanen Geweben

In mRNA-Extrakten aus Gehirn-, Dickdarm-, Dünndarm- und Nierengewebe sowie in den Gehirnabschnitten *Pons*, *Amygdala*, *Hypothalamus*, *Nucleus caudatus*, *Medulla oblongata* und *Hippocampus* wurde die *HTR3A*- und *HTR3B*-Expression mittels qRT-PCR gemessen.

Unter den RNA-Extrakten aus menschlichen Organen [Abbildung 9, links] zeigte das Gehirn die höchste *HTR3B*-Expression. Sie war mit 54 Transkripten pro 100 Transkripten des TATA-box-bindenden Proteins (TBP) mehr als zweifach höher im Gehirn als im Dünndarm mit 24 Transkripten pro 100 TBP-Transkripten und viel höher als im Dickdarm, wo im Durchschnitt 4 Transkripte pro 100 TBP-Transkripte gefunden wurden. In der Niere wurden nur 2 Transkripte pro 100 TBP-Transkripte detektiert. Bei der Analyse von spezifischen Regionen des Gehirns zeigte sich eine sehr hohe Expression des *HTR3B*-Gens in den Mandelkernen (124 Transkripte / 100 TBP-Transkripte) und moderate Expression im *Hippocampus* mit 20 Transkripten und *Nucleus caudatus* mit 11 Transkripten pro 100 TBP-Transkripten. In den Gehirnregionen *Pons*, *Hypothalamus* und *Medulla oblongata* war keine *HTR3B*-Expression zu sehen.

Die absolute Quantifizierung der Transkriptmengen ermöglichte einen direkten Vergleich der *HTR3A*- und *HTR3B*-Expression [Abbildung 9, rechts]. Nur im Dünndarm waren die beiden Gene equimolar exprimiert (24 *HTR3B* zu 22 *HTR3A*-Transkripte / 100 TBP-Transkripte), während im Gehirn *HTR3B* um das 20-fache höher exprimiert war als *HTR3A*. Im Dickdarm war das Verhältnis umgekehrt. Hier war *HTR3A* mit 14 Transkripten / 100 TBP-Transkripten um das 3,5-fache höher exprimiert im Vergleich zu *HTR3B* mit 4 Transkripten / 100 TBP-Transkripten. In der Niere wurde *HTR3A* nicht exprimiert. Im Gehirn konnten nur in den Regionen *Amygdala*, *Nucleus caudatus* und *Hippocampus* signifikante Mengen an Transkripten gemessen werden. Die Regionen der *Pons*, des *Hypothalamus* und der *Medulla oblongata* exprimierten dagegen die Gene *HTR3A* sowie *HTR3B* nicht. Offenkundig waren

die A- und B-Untereinheiten immer ko-exprimiert. Das heißt ohne A-Expression war auch die Untereinheit B nicht exprimiert. Der Vergleich der HTR3A und -B Mengen in den Gehirnregionen zeigte eine 6-fach höhere HTR3B-Expression in den Mandelkernen (124 HTR3B-Transkripte versus 21 HTR3A-Transkripte / 100 TBP-Transkripte) nicht jedoch im *Hippocampus* und *Nucleus caudatus*, in dem ein Verhältnis von 1:1 mit 20 HTR3B-Transkripten zu 15 HTR3A-Transkripten im *Hippocampus* und von 1:2 mit 11 HTR3B-Transkripten zu 23 HTR3A-Transkripten im *Nucleus caudatus* vorlag.

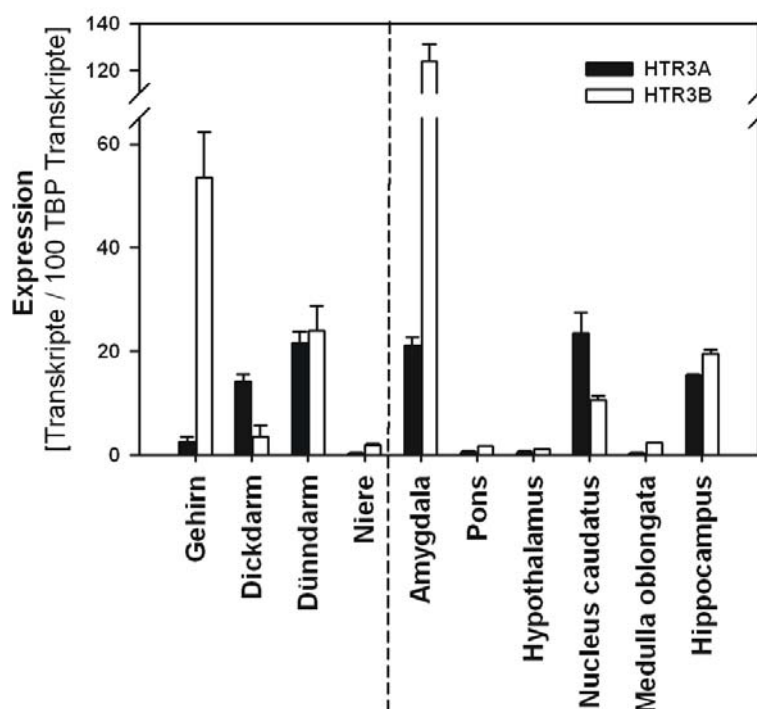


Abbildung 9: HTR3A- und HTR3B-Gewebeexpression: Auf der linken Seite der Abbildung wird die Expression von HTR3A (schwarze Balken) und HTR3B (weiße Balken) im Gehirn, Dickdarm, Dünndarm und Niere verglichen. Auf der rechten Seite der Abbildung wird die Expression in den verschiedenen Regionen des Gehirns genauer dargestellt. Die Expression wird in Transkripten des Zielgens pro 100 Transkripten des Normalisierungsgens TATA-box bindendes Protein (TBP) angegeben. Es werden Ergebnisse dargestellt, die durch quantitative qRT-PCR in Geweben und Gehirnregionen, jeweils gemessen in Triplikaten, entstanden sind. Abgebildet sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen.

3.1.2 HTR3B-Expression in Zelllinien

In Abbildung 10 ist die HTR3B-Genexpression einiger menschlicher Zelllinien dargestellt. Zur besseren Übersicht wurden die Neuroblastom-Zelllinien durch eine Linie von den nicht-neuronalen Laborzelllinien optisch getrennt. Eine HTR3B-Expression von über 1 Transkript pro 100 TBP-Transkripten wurde in den neuronalen SK-N-AS-, Lan-1- und Kelly-Zellen

festgestellt. Die Lan-1-Zellen zeigten mit 4 HTR3B-Transkripten pro 100 TBP-Transkripten die höchste Expression. Bei den anderen Zelllinien exprimierten nur die differenzierten CaCo-2-Zellen (mit dCaCo-2 beschriftet) HTR3B. Bei CaCo-2-Zellen handelt es sich um eine Kolon-Adenokarzinomzelllinie. Interessanterweise konnte die Expression von HTR3B durch Differenzierung der Zellen von < 1 Transkript auf 2,5 HTR3B-Transkripte pro 100 TBP-Transkripte (35-fach) gesteigert werden. In allen anderen untersuchten Zelllinien ist HTR3B im Vergleich zu den genannten Zelllinien gering beziehungsweise nicht exprimiert.

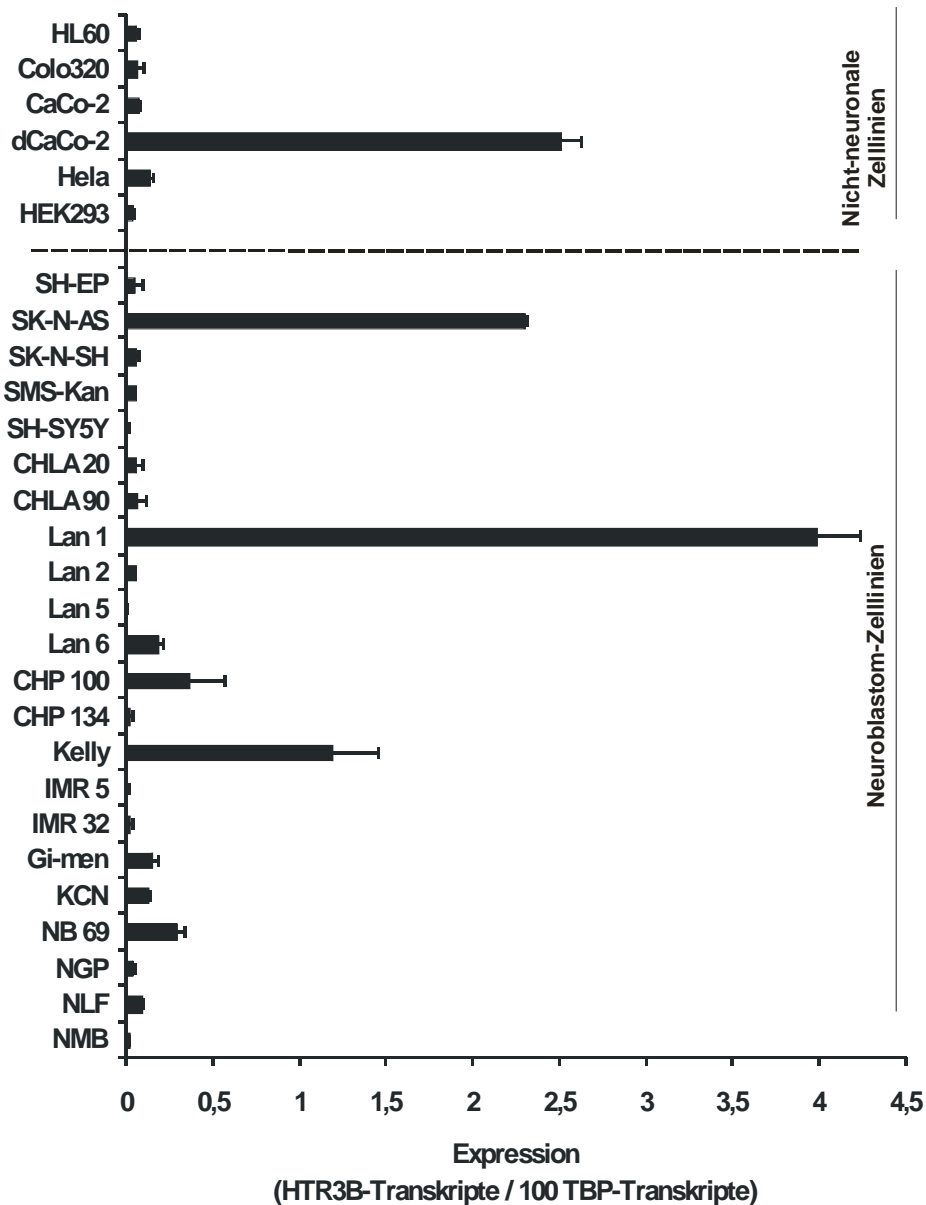


Abbildung 10: Expression des HTR3B-Gens in einer Auswahl menschlicher Zelllinien angegeben in HTR3B-Transkripten pro 100 TBP-Transkripten. Die Ergebnisse wurden mittels qRT-PCR gewonnen. Die Neuroblastom-Zelllinien wurden in Duplikaten, alle anderen Zelllinien in Triplikaten gemessen und in Wiederholungsversuchen verifiziert. Die CaCo-2-Zellen wurden als native CaCo-2 und ausdifferenzierte dCaCo-2-Zellen vermessen. Dargestellt sind die Mittelwerte aller Messungen mit Standardabweichungen.

Des Weiteren wurde die Expression von Htr3b in der Phäochromozytom-Zelllinie PC-12 aus der Ratte in Abhängigkeit vom Differenzierungsstadium untersucht. PC-12-Zellen wachsen unbehandelt als Suspensionskultur, können aber durch Vorbeschichtung der Kulturgefäße mit Collagen auch adhärent wachsen. Im adhären Stadium wurde der Kultur Nerven-Wachstumsfaktor (NGF) in der Konzentration 100 ng/ml zugesetzt, wodurch es zur Differenzierung der Zellen kam. Unter dem Mikroskop konnte die Ausdifferenzierung anhand der Bildung von Dendriten mitverfolgt werden [Abbildung 11A].

Die Htr3b-Expression wurde mittels qRT-PCR bestimmt und mit dem Assay für eukaryotische 18S rRNA als „Housekeeping gene“ normalisiert. Es konnte gezeigt werden, dass Htr3b in der Zelllinie PC-12 der Ratte bereits im undifferenzierten Wachstumsstadium exprimiert ist. Wie in Abbildung 11 dargestellt, führt die Ausdifferenzierung der PC-12-Zellen unter Einfluss des Nerven-Wachstumsfaktors (NGF) zu einer Erhöhung der Expression um den Faktor 7 bis 9. Das Expressionsmaximum wurde schon am 3. Tag der Differenzierung erreicht.

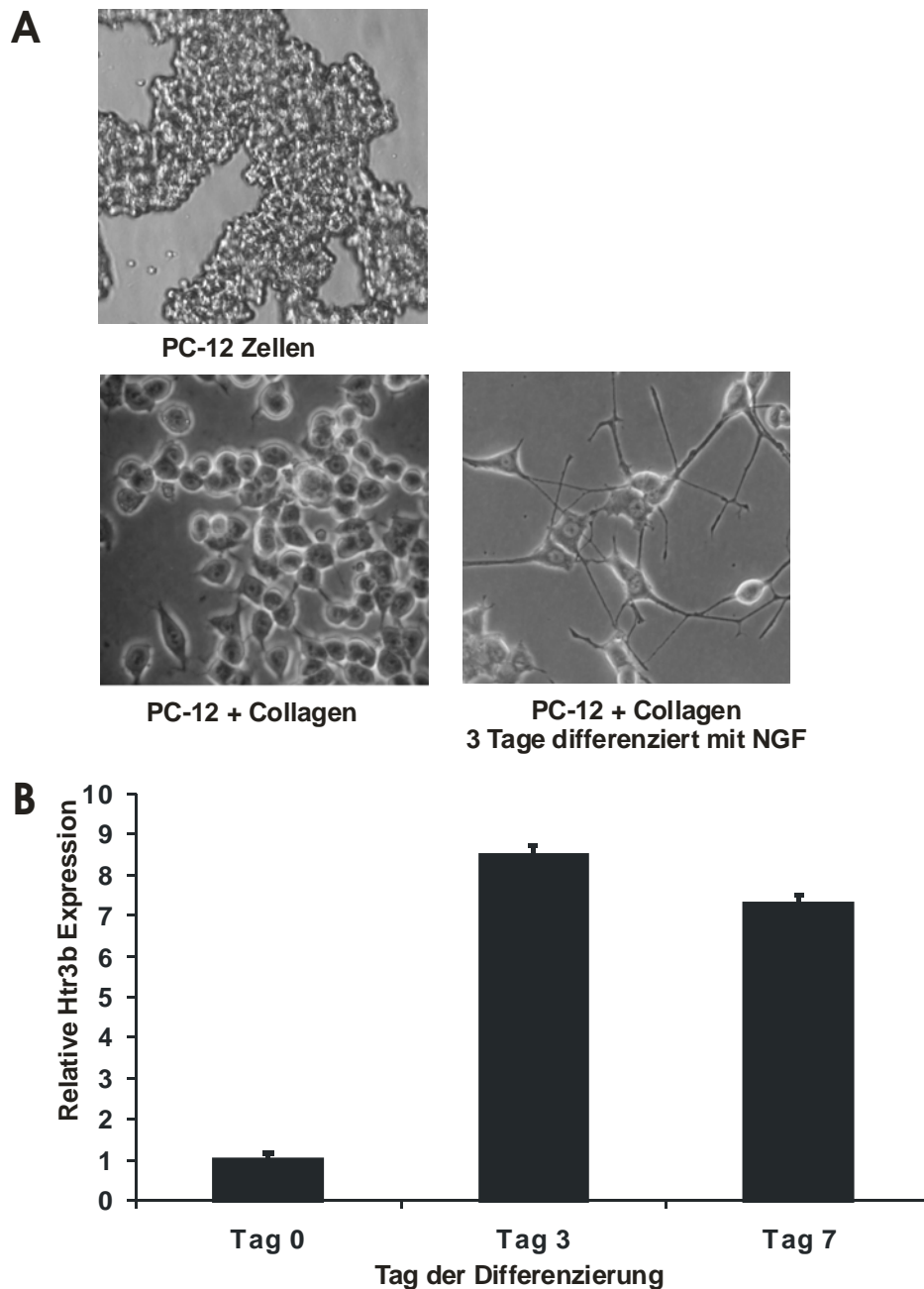


Abbildung 11: Htr3b-Expression in PC-12-Zellen: A) PC-12-Zellen wachsen unbehandelt als Suspensionszellen (100-fache Vergrößerung; Bild oben), können aber durch Vorbeschichtung der Kulturgefäße mit Collagen auch adhärent wachsen (PC-12 + Collagen A; 200-fache Vergrößerung; unten links) und differenzieren durch Zugabe von 100 ng/ml Nerven-Wachstumsfaktor zum Kulturmedium über wenigstens 3 Tage (unten rechts). B) Dargestellt ist das Ausmaß der Htr3b-Expression in Abhängigkeit vom Tag der Differenzierung. Die Streubalken markieren die Standardabweichungen von den Mittelwerten aus je 9 unabhängigen Behandlungen. Normalisiert wurden die Ergebnisse auf den 18S-Gehalt.

Basierend auf den oben gezeigten Analysen der endogenen HTR3B-Expression in menschlichen Zellen und Zellen der Ratte wurde entschieden, für weitere Versuche insbesondere Lan-1- und PC-12-Zellen als „HTR3B exprimierendes Zellmodell“ und HEK293-Zellen als „nicht exprimierendes“ Zellmodell einzusetzen.

3.2 Bestimmung der HTR3B-Transkriptionsstartpunkte

Zur funktionellen Analyse der Genpolymorphismen und speziell der 3-Basenpaar -100/-102 Deletionsvariante [3.5] des HTR3B-Gens ist es entscheidend zu wissen, wo diese Variante in Relation zum Transkriptionsstartpunkt liegt. Die bisher in der NCBI-Datenbank beschriebenen Transkriptionsstartpunkte (AF169255 und AF080582) liegen sowohl im 3'-Bereich als auch im 5'-Bereich des -100/-102 Deletionspolymorphismus.

Durch die Transkriptionsstartanalyse sollte festgestellt werden, ob der betrachtete Polymorphismus transkribiert wird oder nicht. Außerdem war zu untersuchen, ob es möglicherweise gewebespezifische Unterschiede im Transkriptionsstartpunkt gibt. Es wurden mit Gehirn, Dünndarm und Dickdarm die Gewebe ausgewählt, die die höchste HTR3B-Expression gezeigt hatten [3.1.1]. In diesen Geweben wurde der Transkriptionsstartpunkt ermittelt.

3.2.1 Identifizierung der Transkriptionsstartpunkte in primären Geweben

Für die Transkriptionsstartbestimmung wurde die RLM-RACE Methode verwendet [2.2.6]. Zur Kontrolle, dass wirklich nur vormalig 5'-gekappte mRNA-Transkripte im RACE amplifiziert wurden, wurde parallel jeweils eine Probe ohne die Verwendung der sauren Tabak-Pyrophosphatase (TAP) analysiert. Die PCR-Banden nach den RACE-PCRs mit oder ohne TAP sind in Abbildung 12 zu sehen. Die Kontrollen ohne TAP-Behandlung haben auf dem Agarosegel wie erwartet keine scharfen Banden gezeigt. Die Klonierung dieser Kontrollansätze ergab auch ohne sichtbare PCR-Signale einige Klone. Diese Klone enthielten jedoch nur unspezifische Sequenzen, die nicht im Bereich des HTR3B-Gens lagen. Im Vergleich dazu lieferten die mit TAP durchgeführten RLM-RACE Klone ausschließlich Sequenzen, die im Bereich des HTR3B-Gens lagen.

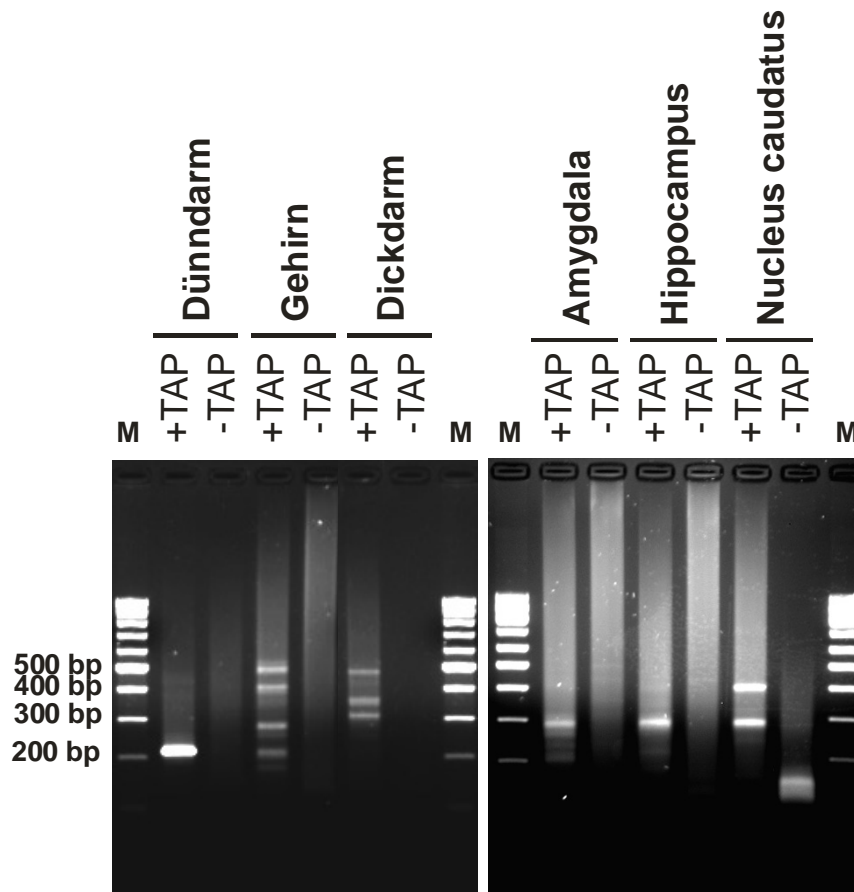


Abbildung 12: PCR-Produkt der „nested“ PCR aus dem RLM-RACE Procedere. Die erwünschten Ergebnisse der PCR, die mit saurer Tabak-Pyrophosphatase durchgeführt wurden, zeigten Banden und sind mit +TAP gekennzeichnet. Die Negativkontrollen bei denen die Behandlung mit TAP weggelassen wurde, wurden mit –TAP bezeichnet und zeigten wie erwartet keine Banden (M = 100 bp Leiter).

Es wurden 50 Klone (Gehirn 30, Dünndarm 10, Dickdarm 10) aus dem RACE-Procedere gewonnen und nach Klonierung durch Sequenzierung analysiert. Es wurden 17 unterschiedliche Transkriptionsstartpunkte im Gehirn, 4 im Dickdarm und ein einziger Transkriptionsstartpunkt im Dünndarm gefunden. Keiner der detektierten Startpunkte stimmte mit denen in der NCBI-Datenbank beschriebenen Startpunkten (AF080582 und AF169255) überein. Die Transkriptionsstartpunkte, die im Dünndarm und Dickdarm gefunden wurden [Abbildung 14], liegen allerdings in der unmittelbaren Nachbarschaft der vormals beschriebenen Transkriptionsstartpunkte. Dagegen lagen alle Transkriptionsstartpunkte, die im Gehirn gefunden wurden [Abbildung 15], in einer 460 Basenpaar großen Region im 5'-Bereich des Exon 2 (in der NCBI-Datenbank als Intron 1 markiert) und der 5'-flankierenden Region des Exon 2. Diese Region liegt mehr als 4000 Basenpaare *downstream* des vorher bekannten HTR3B-Transkriptionsstartpunktes. Das bedeutet, dass allen Transkripten des Gehirns das Exon 1 fehlt. Einige dieser Transkripte enthalten noch bis zu 336 Basenpaare

zusätzlich aus der vormals intronischen Region vor Exon 2 (im Folgenden als Exon 1b bezeichnet) [Abbildung 13]. Dieses Ergebnis zeigte erstmals, dass es zwei gewebespezifisch unterschiedliche HTR3B-Transkriptionsstartbereiche gibt.

Im Folgenden wird der Bereich -2137 bis +28 als Promotorbereich 1 (P1) und der Bereich von +2464 bis +4539 mit Promotorbereich 2 (P2) bezeichnet [Abbildung 13]. Die Positionsangaben beziehen sich auf das ATG-1 der Sequenz AF080582 (eingezeichnet in die Sequenz GI51511727 im Anhang).

Um die Unterschiede im Transkriptionsstartbereich im Gehirn zu bestätigen und um mögliche regionsspezifische Unterschiede im Gehirn zu detektieren, wurden die HTR3B exprimierenden Gehirnregionen *Amygdala*, *Hippocampus* und *Nucleus caudatus* der RLM-RACE-Analyse unterzogen. Es wurde wiederum für jede Probe zusätzlich eine Analyse ohne die Verwendung von TAP als Kontrolle durchgeführt. Klare PCR-Signale waren nur in den mit TAP behandelten Proben zu sehen [Abbildung 12]. In allen drei analysierten Gehirnregionen bestätigte sich der alternative Transkriptionsstart in der 460 Basenpaar umspannenden Region vor und in Exon 2, wie sie für das Gehirn gefunden wurde. Es fanden sich keine gehirnregionsspezifischen Unterschiede zwischen den Mandelkernen und dem *Hippocampus*. Nur eine kleine Divergenz im Transkriptionsstartpunkt konnte für die Region des *Nucleus caudatus* detektiert werden, wo der am weitesten 5'-liegende Startpunkt 160 Basenpaare oberhalb der in den Mandelkernen und dem Hippocampus gefundenen Startpunkte lag. In allen drei Gehirnregionen fanden sich auch Transkriptionsstartpunkte innerhalb der Exon 2 Sequenz. Bei der Untersuchung der Bereiche P1 und P2 auf mögliche Transkriptionsstartelemente zeigte sich weder eine TATA-Box noch ein CpG-Bereich. Nur in P2 wurde eine mit der Konsensussequenz Py-Py-A₊₁-N-T/A-Py-Py für das Initiatorelement übereinstimmende Sequenz (gekennzeichnet mit **) und einige Startpunkte, die sich nur durch einen *Mismatch* von der Konsensussequenz unterschieden (mit * gekennzeichnet), gefunden [Abbildung 15]. Keiner der Transkriptionsstartpunkte wies zusätzlich ein *downstream* Promotorelement auf [78].

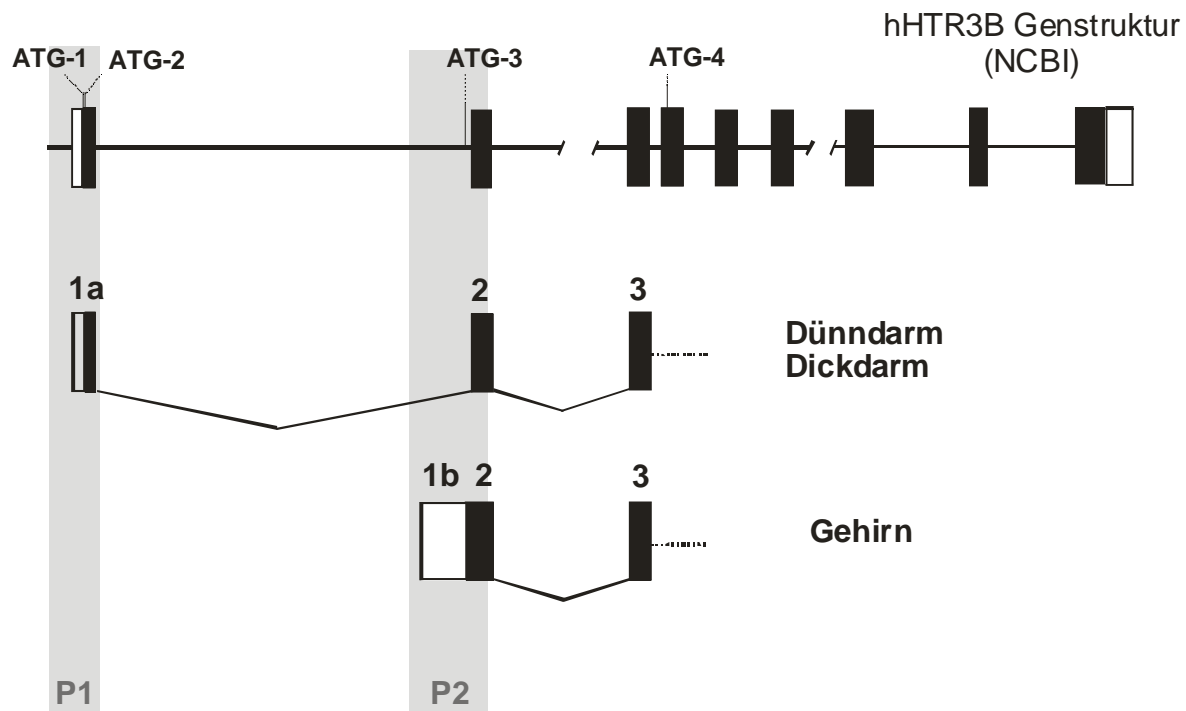


Abbildung 13: Alternative Transkriptionsstartpunkte des HTR3B-Gens. Oben die Genstruktur des humanen HTR3B-Gens, wie sie in der NCBI-Datenbank für das Gen HTR3B angegeben ist. Schwarze Rechtecke symbolisieren die kodierenden Bereiche der Exons, weiße Kästen stehen für 5'- und 3'UTR-Regionen. Die möglichen alternativen Translationsstartpunkte sind mit ATG und einer durchlaufenden Nummer bezeichnet. Die Sequenzen der zwei Transkriptionsstartbereiche sind mit Promotor 1 (P1) und Promotor 2 (P2) bezeichnet und in hellgrau markiert.

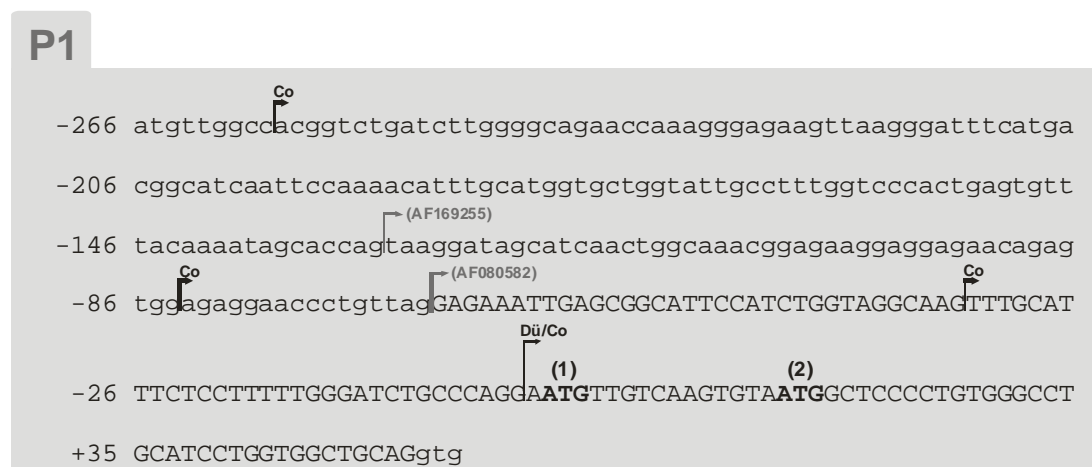


Abbildung 14: Dargestellt sind die HTR3B-Transkriptionsstartpunkte, die durch RLM-RACE in der Region P1 detektiert wurden. Die Sequenz GI:51511727 wurde nummeriert beginnend von „A“ des ATG-1 Kodons, das als Position +1 AF080582 angegeben ist. Die Exon-Sequenzen laut dieser Referenzsequenz sind in Großbuchstaben geschrieben, die intronischen Sequenzen in kleinen Buchstaben. Die exakte Position der gefundenen Transkriptionsstartpunkte wurde mit Pfeilen gekennzeichnet und mit dem Organ bezeichnet, in dem sie gefunden wurden: Dü für Dünndarm, Co für Kolon. Die vollständigen cDNAs, wie sie von Daves et al. (AF080582) und Dubin et al. (AF169255) beschrieben wurden, sind eingezeichnet. Translations-Startkodons wurden mit fetten Buchstaben gekennzeichnet.

P2

```

+4012 ggtgggttttttctG*agatgctaggagaggatgatacaggaataaagaGatttattctgtct
+4072 ccaaaatgGaagattggtgtaaaatggaattgtaggtacagttttccaaccttgagatg
+4132 gcgttgatttacttgtttttacaatgaggtttctccattgggcacttaggccatcagctt
+4192 actttaagcatttgccaaaggccccaccagctggctgtgaattgatgG/Am/Hiagattttggtga
+4252 gctgaaagctatG*attctG/NCagtaaaagccaccgagtcctGaacG/Lan1*agtcctgaaacctcctaaag
+4312 aaaccaagctcctcttacttttatcttG/Am(3)acaAm*atgataGgtttattttccagGAATTCTAGC
+4372 CACAGATACACATCATCCCCAGGATTCTGCTCTGGTATHi/Lan1CATCTCAGCAAGCAGCTATTACA
+4432 GAAATATGATATAAmGAAGAGGAGTGGAGACCTGTTTACAGACTGGACCAAGGCCACCACAGTCTACCT

```

Abbildung 15: Dargestellt sind die Transkriptionsstartpunkte in der Sequenz der Region P2. Die Sequenz GI:51511727 wurde nummeriert, beginnend von ATG-1 als Position +1 (Referenzsequenz AF080582). Die Exon-Sequenzen laut dieser Referenzsequenz sind in Großbuchstaben geschrieben, die intronischen Sequenzen in kleinen Buchstaben. Die exakte Position der gefundenen Transkriptionsstartpunkte wurde mit Pfeilen gekennzeichnet und mit dem Organ bezeichnet in dem sie gefunden wurden: G für Gehirn und für die Gehirnregionen Hi für *Hippocampus*, Am für *Amygdala* und NC für *Nucleus caudatus*, Lan-1 für die Lan-1-Neuroblastom-Zelllinie [3.2.2]. Potentielle alternative Translationsstartkodons wurden mit fetten Buchstaben gekennzeichnet. Mit ** ist die einzige Initiator-Sequenz gekennzeichnet, die exakt mit der Konsensussequenz übereinstimmt, mit * diejenigen mit einem *Mismatch*.

3.2.2 Identifizierung der Transkriptionsstartpunkte in der Gewebekultur

Analog der in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Analyse wurde der Transkriptionsstart in den endogen HTR3B exprimierenden Zelllinien Lan-1 und in differenzierten CaCo-2-Zellen ermittelt. Es zeigte sich, dass in den neuronalen Lan-1-Zellen (Neuroblastom-Zelllinie) ebenso der alternative Transkriptionsstart im Bereich des Exon 1b / Exon 2 verwendet wird [Abbildung 15], wie er auch im Gehirn gefunden wurde. Unerwarteterweise fanden sich in den Kolon-Adenokarzinom-Zellen CaCo-2 zwei außergewöhnliche Transkriptionsstartpunkte. 77% der Transkriptionsstartpunkte lagen weit im 5'-Bereich des beschriebenen Exon 1, in Abbildung 16 mit 1c gekennzeichnet, die restlichen begannen in einer von E 1b unterschiedlichen Region zwischen Exon 1 und Exon 2 im NCBI-Intron 1, das mit 1d gekennzeichnet wurde.

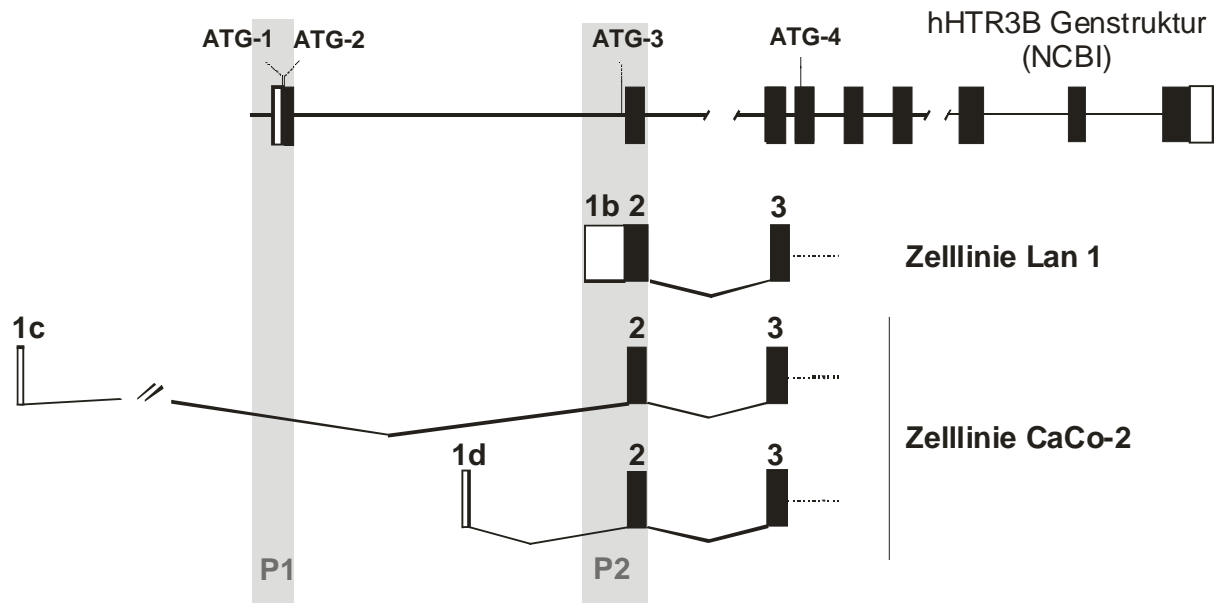


Abbildung 16: Dargestellt sind die HTR3B-Transkriptionsstartpunkte, die durch RLM-RACE in den endogen HTR3B exprimierenden Zelllinien Lan-1 und CaCo-2 detektiert wurden. Darüber zur Orientierung die Genstruktur, wie sie in der NCBI-Datenbank für das Gen HTR3B angegeben ist.

Nach der Entdeckung der alternativen Promotorregion P2 im Gehirn wurde die NCBI-Datenbank nochmals auf vollständige HTR3B-cDNA-Sequenzen und *Expressed Sequence Tags* (EST) untersucht, die das Exon 2 des HTR3B-Transkriptes enthielten. Außer den schon erwähnten vollständigen cDNA-Klonen fanden sich zwei weitere EST Einträge (GI:78726871 und GI:82331599). Einer der so gefundenen Transkriptionsstartpunkte wurde aus einer Gehirn-cDNA-Bibliothek generiert und hatte auch den alternativen Transkriptionsstartpunkt. Dies kann als weiterer Hinweis auf die Existenz des alternativen gehirnspezifischen Promotors 2 gesehen werden. Die zweite Sequenz (GI:82331599) aus der humanen SK-N-MC Zelllinie zeigte einen Transkriptionsstartpunkt in der für den Dünn- und Dickdarm typischen Region P1.

3.2.3 Voraussage der primären Proteinstruktur aufgrund der alternativen Transkripte

Betrachtet man die Ergebnisse dieser Transkriptionsstartbestimmung wird deutlich, dass nur für die mRNA, die im Dickdarm gefunden wurde, das in der NCBI-Datenbank beschriebene Startkodon (hier als ATG-1 bezeichnet) relevant sein kann. Schon für das Transkript im Dünn- und Dickdarm, das an der Position -1 bezogen auf das ATG-1 beginnt, wird vermutlich nicht das ATG-1, sondern das nächstmögliche *downstream* liegende ATG (im Folgenden als ATG-2 bezeichnet) der Translationsstartpunkt sein. Diese

Vermutung ist begründet auf der von Marilyn Kozak [79] beschriebenen Tatsache, dass die Translationsinitiation einen starken Kontext braucht, nämlich ein Adenin oder Guanin an der Position -3 und ein Guanin an der Position +4. Dieser Kontext ist am ATG-2 gegeben. Aus diesem Translationsstartpunkt müßte ein um fünf Aminosäuren verkürztes Protein resultieren (in Abbildung 17B als 5-HT_{3B} bezeichnet). Dieser Translationsstartpunkt wurde auch schon von Hanna et al. als solcher bezeichnet [80]. Es wurden zwei weitere *in frame* liegende mögliche ATG-Kodons, das ATG-3 und das ATG-4, für die Transkripte im Gehirn gefunden. Für die langen Transkripte im Gehirn, die im Bereich des NCBI-Introns 1 (Exon 1b) lagen, ist das wahrscheinlichste ATG-Kodon das ATG-3, das noch vor Exon 2 liegt. Die hinter dem ATG-3 beginnenden Transkripte, die im Gehirn gefunden wurden, können als Startkodons nur das ATG-4 haben. Die Positionen der potentiellen Startkodons wurden schematisch dargestellt in Abbildung 17A.

Der Aufbau der Proteine, die sich aus den alternativen Translationsstartpunkten ergeben, sind in Abbildung 17B dargestellt. Als Haupt-Protein aus Dünn- und Dickdarm ist das 5-HT_{3B}-Protein dargestellt, das den Translationsstartpunkt am ATG-2 hat. Die Gehirn-1-Isoform hatte ein kürzeres Signalpeptid mit zusätzlichen aus Exon 1b resultierenden Aminosäuren. Der Translationsstartpunkt der Gehirn-2-Isoform lag erst im Exon 4, wodurch das Protein sehr stark verkürzt wird. Diese Isoform wäre um das Signalpeptid und den Bereich in dem sich auch die $\beta 1$ - $\beta 2$ -Schleife befindetet trunziert.

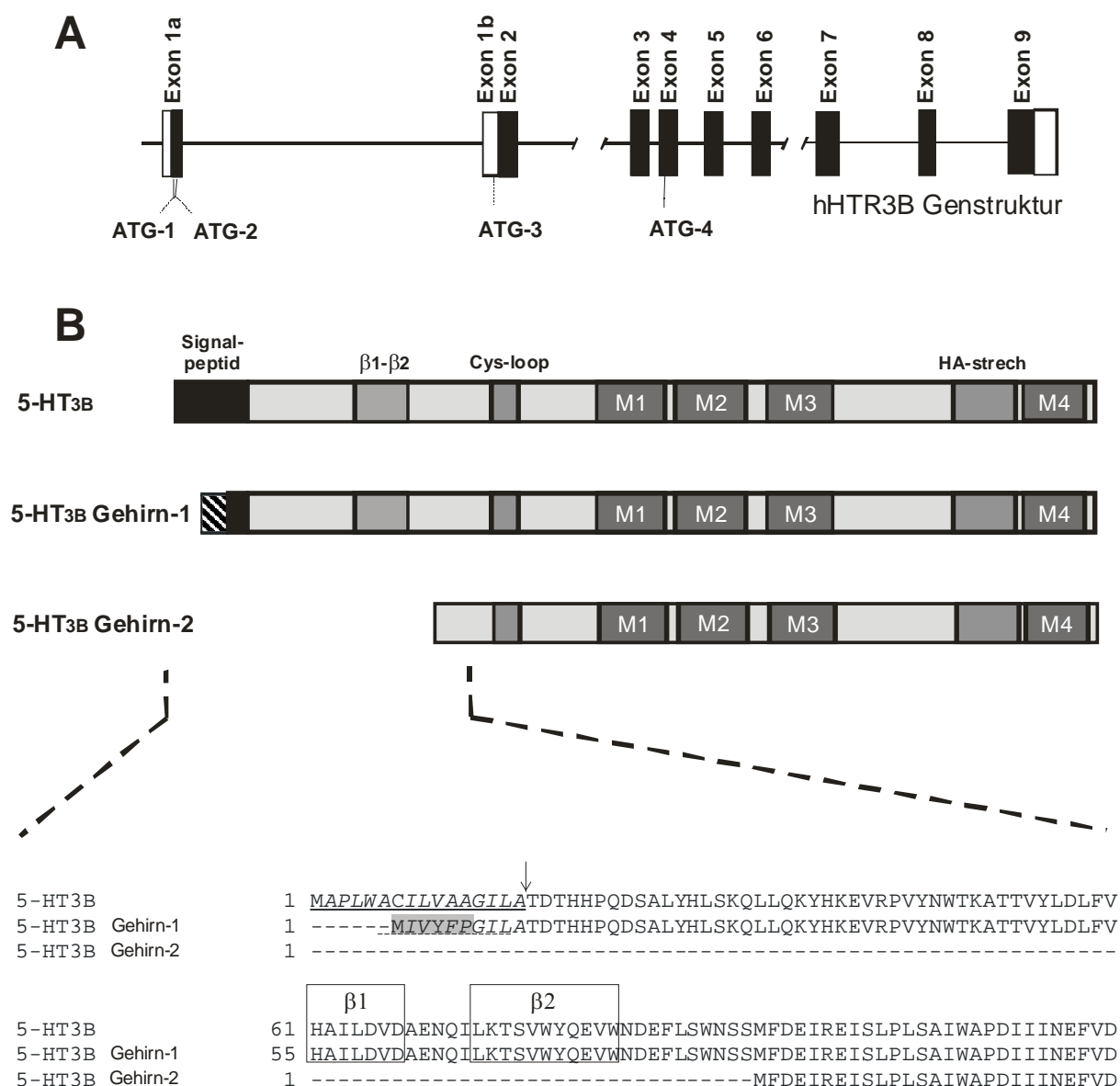


Abbildung 17: Vorrausgesagte gewebespezifische 5-HT_{3B}-Proteinstrukturen A) In die hHTR3B-Genstruktur in der die Exons 1-9 als schwarze Balken gekennzeichnet sind und die 5'- und 3'-nichttranslatierte Region in weißen Balken dargestellt sind, wurden die alternativen Translationsstartpunkte ATG-1, ATG-2, ATG-3 und ATG-4 eingezeichnet. B) Der Aufbau der Proteinstruktur und die N-terminalen Proteinsequenzen der Isoformen von 5-HT_{3B}, die sich aus den Translationsstartpunkten ergeben, im Vergleich: zuoberst die im Dünndarm gefundene Isoform, die vermutlich beim ATG-2 startet, darunter die 5-HT_{3B} Gehirn-1-Isoform, die beim ATG-3 beginnt und ganz unten die 5-HT_{3B} Gehirn-2-Isoform, die beim ATG-4 ihren potentiellen Translationsstartpunkt hat. Die bekannten funktionellen Proteindomänen sind mit Kästen markiert. Das Signalpeptid in schwarz, die β1-β2 Schleife sowie Cys-Schleife und HA-strech in dunkelgrau und die 4 Transmembranregionen sind mit M1 bis M4 beschriftet [34, 35, 81]. In der Vergrößerung darunter wird der in den Gehirnregionen trunkierte Bereich der Aminosäuresequenz gezeigt. Die Signalsequenz für die Erkennung am Endoplasmatischen Retikulum (unterstrichen) und die Schnittstelle der Signalpeptidase (Pfeil) sind eingezeichnet wie sie bei Davies et al. [35] beschreiben sind. Darunter sind in grau die zusätzlichen Aminosäuren im Signalsequenzbereich für die Gehirn-1-Isoform markiert. Das daraus resultierende Protein sollte unverändert sein. Im Falle der Gehirn-2-Isoform fehlt der gesamte Signalpeptidbereich sowie der Bereich der β1-β2 Schleife (rechteckig markiert).

3.2.4 Bestätigung der Transkriptionsstartpunkte

Zur Verifizierung der beiden unterschiedlichen Haupt-Transkripte im Gehirn, Dünndarm und Dickdarm wurde eine diskriminierende qRT-PCR durchgeführt. Die Primer wurden so gelegt, dass in der einen PCR nur die langen Transkripte detektiert werden. Diese enthalten Sequenzen, die im Exon 1a liegen (Primer E1a_f und E1a_r). In einer weiteren PCR werden die kurzen Transkripte, die im Exon 1b beginnen (Primer E1b_f und E1b_r), selektiv detektiert. Die Summe aller Transkripte wird schließlich durch eine dritte PCR ermittelt, die einen Bereich im Exon 2 bis Exon 3 amplifiziert (Primer E2/3_f und E1b_r). Die Differenz der Summe aus den PCR-Produkten E1a und E1b zu der Menge an E2/3 entsprach der Menge der trunkierten kurzen Gehirntranskripte (5-HT_{3B} Gehirn-2-Isoform). Als Kontrollen für diesen Versuch wurde je ein pCR-XL-TOPO-Klon aus dem RACE-Verfahren verwendet [3.2.1]. Der Kontrollklon für das Produkt E1a stammte aus der Transkriptionsstart-Analyse aus Dickdarmgewebe. Als Kontrolle für das E1b-Produkt wurde ein Klon ausgewählt, der aus der Transkriptionsstartbestimmung aus dem Gehirn stammte und dessen Transkriptionsstart im Exon 1b lag. Die qRT-PCR mit diesen Klonen bestätigte den Erfolg dieser diskriminierenden Transkriptdetektionsmethode.

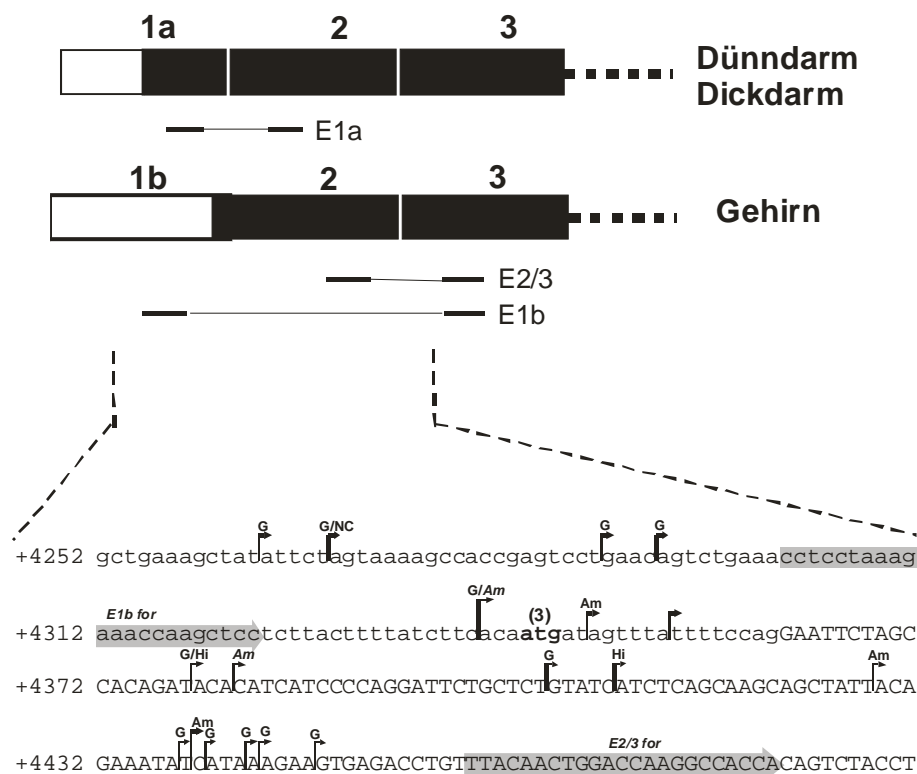


Abbildung 18: Schematische Darstellung der transkriptspezifischen qRT-PCRs. Die Exons werden durch schwarze Balken dargestellt. Die Primer für das E1a- und E1b-Produkt wurden so ausgewählt, das sie spezifisch sind für den Promotorbereich P1 und P2. Das PCR-Produkt E2/3 dagegen detektiert alle Transkripte unabhängig von ihrem Transkriptionsstartpunkt. Wie in der Vergrößerung dargestellt, liegt

der Primer E1b_f im ursprünglich als intronisch bekannten Bereich (durch kleine Buchstaben gekennzeichnet). Der Primer E2/3_f liegt dagegen auf dem als Exon 2 gekennzeichneten Bereich (Großbuchstaben), der in allen Transkripten vorhanden ist. Abkürzungen: G Gehirn, NC *Nucleus caudatus*, Am *Amygdala*, Hi *Hippocampus* und (3) für das ATG-3. Das Ergebnis der Analyse wird in Abbildung 19 dargestellt.

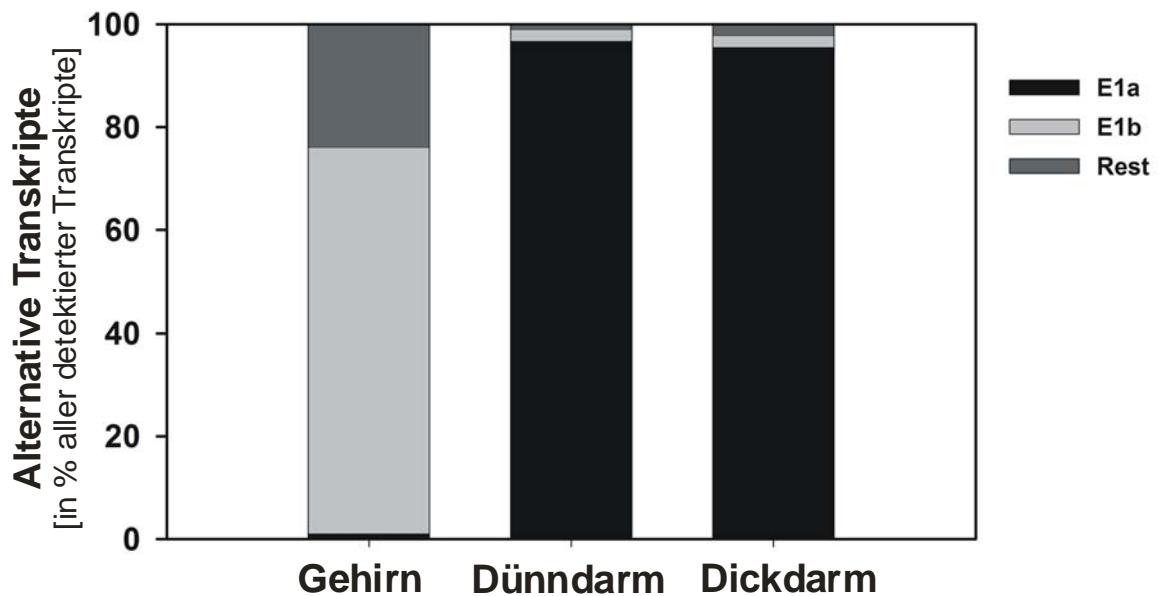


Abbildung 19: Quantifizierung der kurzen und langen Transkripte im HTR3B-Gen. Die alternativen Transkripte E1a (langes Transkript) und E1b (kurzes Transkript) des HTR3B-Gens in verschiedenen Organen sind prozentual dargestellt. In Schwarz anteilig die Menge an E1a-Transkripten, in hellgrau die E1b-Anteile und in dunklem Grau die Differenz der Summe aus E1a und E1b zu der Gesamttranskriptmenge E2/3, die hier als Rest bezeichnet wird. Dieser Rest steht für die Menge der kurzen Gehirnttranskripte.

Die qRT-PCR bestätigte die Existenz der alternativen Transkripte und bestätigte ferner die Gewebespezifität der alternativen Transkripte für das Gehirn. Die Häufigkeiten der Transkripte im Gehirn, Dünndarm und Dickdarm sind in Abbildung 19 prozentual dargestellt. Die meisten Transkripte im Dünndarm (96,7%) und Dickdarm (95,5%) enthielten das Exon 1a. Im Gehirn dagegen fanden sich dagegen nur alternative Transkripte. Der Anteil an Exon 1a lag bei weniger als 1% und kann, aufgrund erwarteter Schwankungen bei qRT-PCR Messungen, vernachlässigt werden. Die Betrachtung der Verteilung der alternativen Transkripte im Gehirn zeigte, dass ein Viertel der Transkripte (23,9%) nicht das ATG-3 enthalten und somit nicht für die längere 5-HT_{3B} Gehirn-1-Isoform kodieren können, während die Mehrzahl der Transkripte (75,2%) für die HT_{3B} Gehirn-1-Isoform kodieren.

3.2.5 Klonierung des offenen Leserahmens aus Gehirngewebs-mRNA

Der vollständige offene Leserahmen (ORF) des HTR3B-Gens wurde aus Gehirn-RNA kloniert [2.2.8.6]. Es zeigten sich bei den untersuchten zwei cDNA-Klonen keine Mutationen oder *Splicevarianten*. Dieses Ergebnis reduziert die Wahrscheinlichkeit, dass im Bereich des ORF nach dem Exon 2 alternatives *Splicing* stattfindet.

3.3 Promotorbereiche des HTR3B-Gens

Durch die in Abschnitt 3.2 beschriebenen Versuche wurde festgestellt, dass das HTR3B-Gen von zwei gewebespezifischen Promotoren reguliert wird. Diese sind mit Promotor 1 (P1) und Promotor 2 (P2) bezeichnet [Abbildung 13]. In den Datenbanken sind bisher keine alternativen Promotoren für das HTR3B-Gen beschrieben. Der Promotorbereich P2 liegt ca. 4000 Basenpaare *downstream* von dem Bereich, der als Promotor 1 (P1) bezeichnet wird. Die Promotorbereiche P1 und P2 des HTR3B-Gens wurden mittels Luziferase-Reportergen-Analyse auf Promotoraktivität untersucht.

3.3.1 Funktionelle Untersuchung des Promotorbereiches P1

Der hier als P1 untersuchte Abschnitt umfasste den Bereich von -2137 bis +28 der Sequenz GI51511727 bezogen auf das ATG-1 (AF169255, AF080582 Sequenzen siehe Anhang). Dieses 2164 bp lange DNA-Segment wurde in den Luziferasevektor pXP2 in richtiger und invertierter Orientierung kloniert. Die entstandenen Klone wurden HTR3B:P1 und HTR3B:invP1 genannt [2.2.8.3].

Die Plasmide HTR3B:P1 und HTR3B:invP1 wurden in unterschiedliche Zelllinien transient transfiziert: zunächst in die Colo320- und HEK293-Zellen, die keine konstitutive HTR3B-Expression haben, und sodann in die nach Differenzierung HTR3B exprimierenden CaCo-2-Zellen und in die endogen Htr3b/HTR3B exprimierenden Zelllinien PC-12 (Ratte) und Lan-1. Überraschenderweise zeigte P1 nur in den nicht endogen HTR3B exprimierenden Zellen Colo320 und HEK293 eine Promotoraktivität (HEK293 8-fach und Colo320 7-fach im Vergleich zum Leervektor pXP2). In allen anderen Zelllinien konnte keine erhöhte Promotoraktivität im Vergleich zum Leervektor beobachtet werden [Abbildung 20]. Das Plasmid mit dem invertierten Promotorabschnitt zeigte nach Transfektion in HEK293-Zellen keinen signifikanten Anstieg in der Luziferaseaktivität verglichen mit der pXP2

Grundaktivität (Daten nicht dargestellt). Nach diesen Ergebnissen wurde für anschließende Untersuchungen des P1-Promotors die Zelllinie HEK293 als Modellzelllinie verwendet.

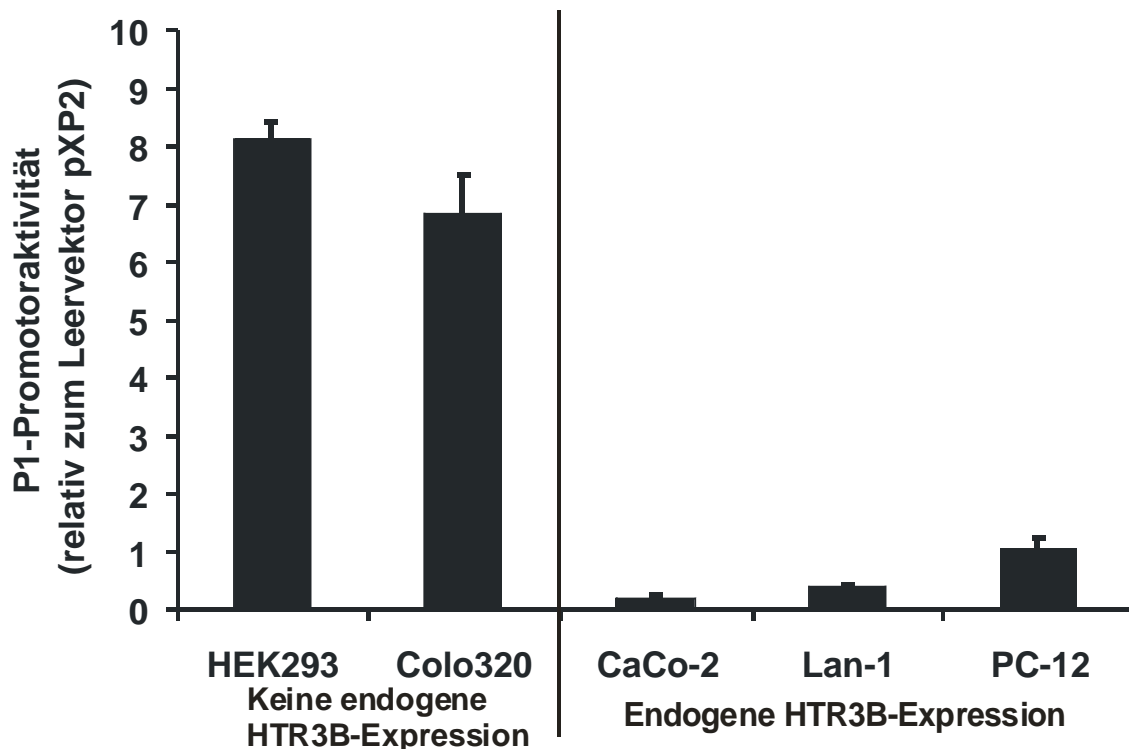


Abbildung 20: Das Reportergenkonstrukt HTR3B:P1, das die Region -2137 bis +28 bezogen auf das ATG-1-Kodon des HTR3B-Gens enthält, wurde in verschiedene Zelllinien transfiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte (HEK293 Mittelwerte von 8 Messungen an insgesamt 3 Versuchstagen (8:3), Colo320 (2:1), CaCo-2 (3:1), Lan-1 (2:1) und PC-12 (2:1)) mit Standardabweichungen. Alle Werte wurden auf den pXP2-Leervektor bezogen.

3.3.2 Verkürzung des P1 Fragmentes

Um die beobachtete Promotoraktivität des 2164 bp großen Fragmentes in HTR3B:P1 besser verstehen zu können und um für die Transkription relevante Bereiche zu detektieren, in denen potentiell Transkriptionsfaktoren ansetzen könnten, wurden verkürzte Teile des P1 Fragmentes in den Luziferase-Reportergen-Vektor pXP2 kloniert. Es wurden am 5'-Ende verkürzte Abschnitte des Fragmentes hergestellt, die 1182 bp, 821 bp, 538 bp, und 286 bp lang waren. Zusätzlich wurde ein im 3'-Bereich verkürztes Konstrukt hergestellt (für Details siehe 2.2.8.4). Die Konstrukte wurden in HEK293-Zellen transient transfiziert.

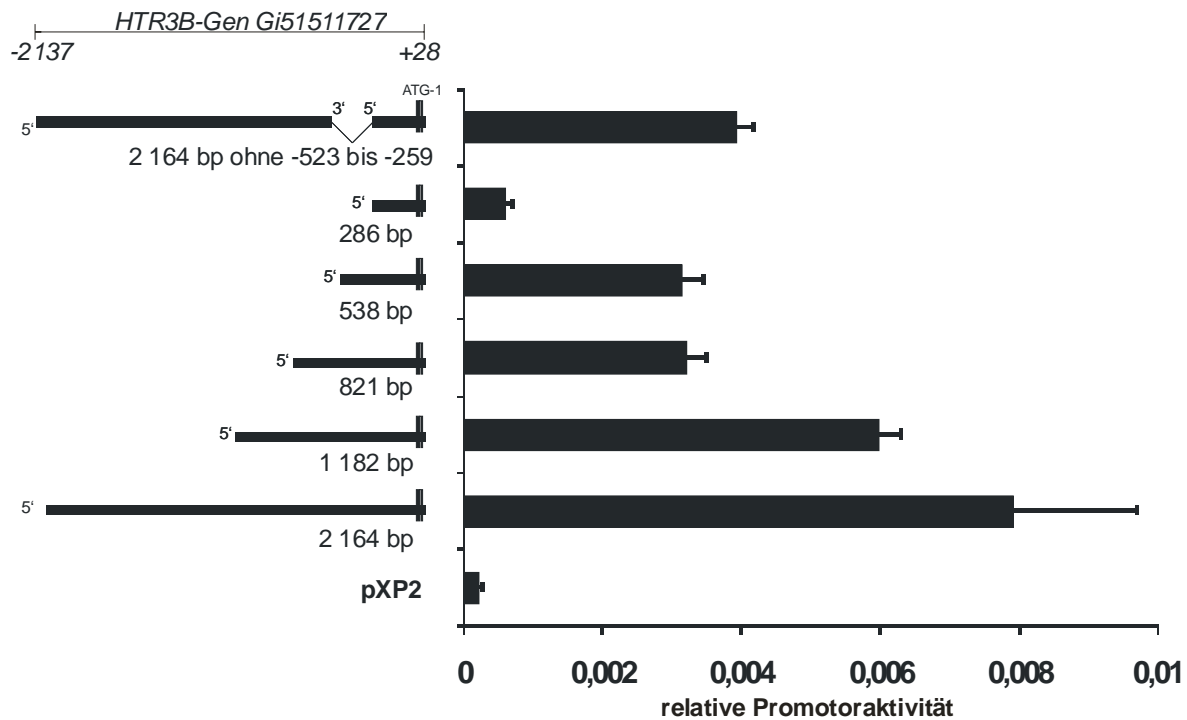


Abbildung 21: Transiente Transfektion von verkürzten pXP2 Luziferase-Reportergen-Konstrukten in HEK293-Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 3-fach Messungen.

Das 2 kb Konstrukt zeigte die höchste Promotoraktivität. Mit zunehmender Verkürzung ist eine Reduktion der Promotoraktivität zu sehen. Die Verkürzung auf 1182 Basenpaare hatte nur einen geringen Effekt. Eine relevante Abnahme der Promotoraktivität um ca. 50% war durch die Reduktion auf 821 Basenpaare zu beobachten. Die Verkürzung des 821 Basenpaar-Konstruktes auf 538 Basenpaare zeigte keinen Effekt auf die Aktivität des Promotors. Eine weitere Reduktion zusätzlicher Basenpaare auf eine Größe von 286 Basenpaaren resultierte in einem relevanten Verlust der Aktivität um weitere 40%. Die 3'-verkürzte Variante, in der der Bereich -523 bis -259 Basenpaare (Positionen bezogen auf das ATG-1) entfernt wurde, zeigte eine um 40% reduzierte Promotoraktivität. Dies könnte aus der Summe der Aktivitäten resultieren, die beim 286 Basenpaar-Konstrukt gesehen wurde (10%) und der Aktivität, die zwischen 2164 Basenpaaren und 821 Basenpaaren liegt (50%). Zusammenfassend lässt sich aus diesen Daten vermuten, dass für die Transkription wichtige Regionen im Bereich der Basenpaare -523 bis -259 und im Bereich der Basenpaare -1154 bis -793 (entspricht dem Bereich zwischen dem 1182 bp und dem 821 bp Segment) bezogen auf das ATG-1-Kodon liegen. Diese beiden Regionen zeigten unabhängig voneinander eine Promotoraktivität.

Bioinformatische Analysen für diese Bereiche mit Hilfe der TRANSFAC-Datenbank [82] (Vorauswahl: Wirbeltiere, Option: Minimierung falsch positiver Ergebnisse) erbrachte im Bereich -1154 bis -793 Basenpaare, bezogen auf das ATG-1, potentielle Bindungsstellen für

Forkhead box P3 (FOXP3), *GATA-bindendes Protein* (GATA4) und *Interferon regulierender Faktor 7* (IRF7). Im Bereich -523 bis -259 Basenpaare könnten FOXP3, *Transcription factor 1* (HNF1), *Nuclear factor kappa B* (NFkappaB) und *Transcription factor IIA* (TFIIA) binden.

3.3.3 Genotypisierung des alternativen Promotorbereiches (P2)

Zunächst wurde eine Auswahl von 20 DNA Proben, die in der Studie von Trembley et al. [52] schon auf Polymorphismen in allen Exons und in den 5'- und 3'-Regionen des HTR3B-Gens untersucht worden waren, für den Bereich +2116 bis +4637 der Sequenz GI51511727 sequenziert. Damit sollten mögliche Varianten in diesem alternativen Promotor gefunden werden. Es wurden nur solche Patienten ausgewählt, die entweder durch besonders häufiges Erbrechen aufgefallen waren oder solche, die kein Erbrechen gezeigt hatten. In dem gesamten untersuchten Bereich P2 wurde kein einziger Polymorphismus detektiert. Damit kann mit 87%iger Wahrscheinlichkeit behauptet werden, dass in diesem Bereich keine Polymorphismen mit einer Allelhäufigkeit von mehr als 5% existieren.

3.3.4 Funktionelle Untersuchung des Promotorbereiches P2

Für die funktionelle Untersuchung des alternativen Promotorbereiches (Promotor 2 (P2)) wurde der Abschnitt von +2464 bis +4539 Basenpaare hinter dem ATG-1 entsprechend der Sequenz GI51511727 in den Luziferasevektor pXP2 kloniert (HTR2B:P2) [2.2.8.3]. Es wurden zwei unabhängig voneinander generierte Klone in die Zelllinien PC-12 und Lan-1 transient transfiziert. Alle Zelllinien zeigten eine, um mindestens einen Faktor von 4,5, erhöhte Promotoraktivität des P2 Bereiches bezogen auf den Leervektor pXP2. Dies zeigte sich auch in endogen HTR3B exprimierenden Zellen, die für P1 nur eine schwache bis keine Promotoraktivität gezeigt hatten. In HEK293-Zellen zeigte P2 eine Aktivität, die jedoch unter der für P1 gemessenen Aktivität lag.

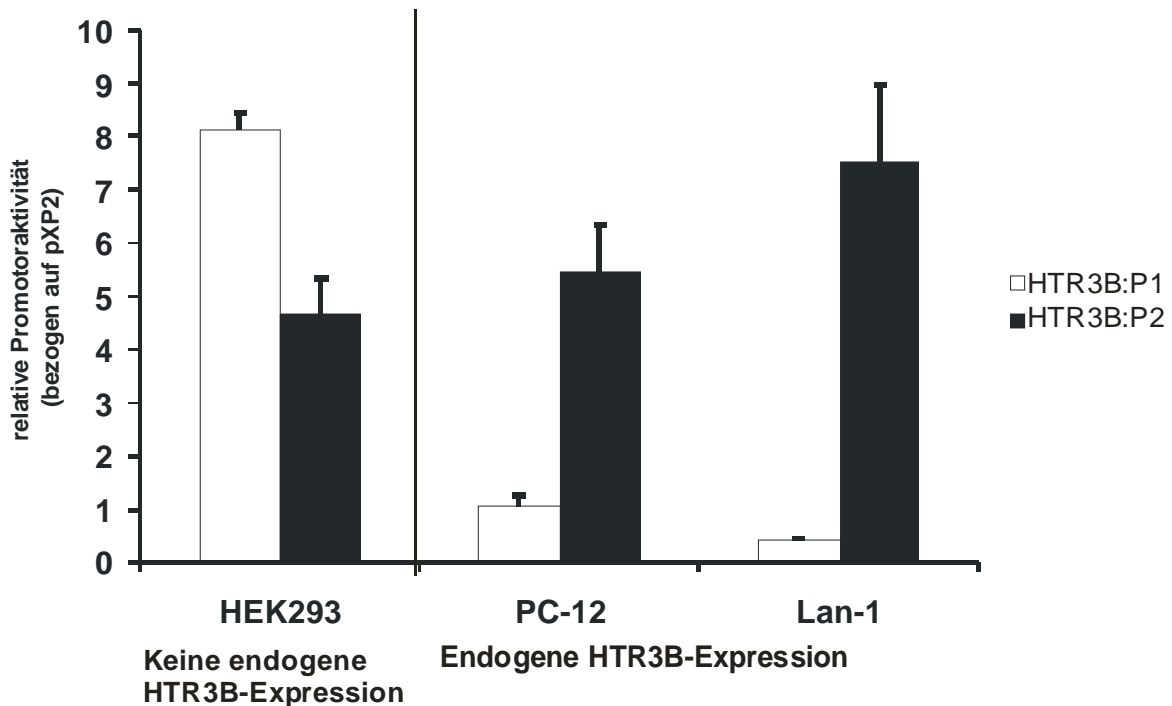


Abbildung 22: Vergleich der Promotoraktivität von HTR3B in konstitutiv HTR3B exprimierenden und nicht-exprimierenden Zelllinien. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Luziferaseaktivität von HTR3B:P2 bezogen auf den Leervektor pXP2 (schwarze Balken). Die Werte setzten sich wie folgt zusammen: im Falle der HEK293-Zellen aus 6 Messungen an einem Versuchstag (6:1), PC-12 (6:1) und Lan-1 (8:2) mit je 2 getrennt hergestellten genetisch identischen Klonen. Um die Werte mit der für P1 gemessenen Promotoraktivität vergleichen zu können, wurden diese als weiße Balken im Bild mit aufgezeigt.

Für PC-12-Zellen wurde die Promotoraktivität auch im Vergleich zwischen differenzierten versus nicht differenzierten Zellen untersucht. Dazu wurden PC-12-Zellen mit Nerven-Wachstumsfaktor-haltigem (NGF) Medium kultiviert. Am 2. Tag der NGF-Kultivierung wurden die Zellen transient transfiziert. Am 5. Tag wurden die Zellen geerntet und die Luziferaseaktivität gemessen. Durch Differenzierung der PC-12-Zellen erhöhte sich die Promotoraktivität sowohl des P1-Promotors als auch des P2-Promotors [Abbildung 23].

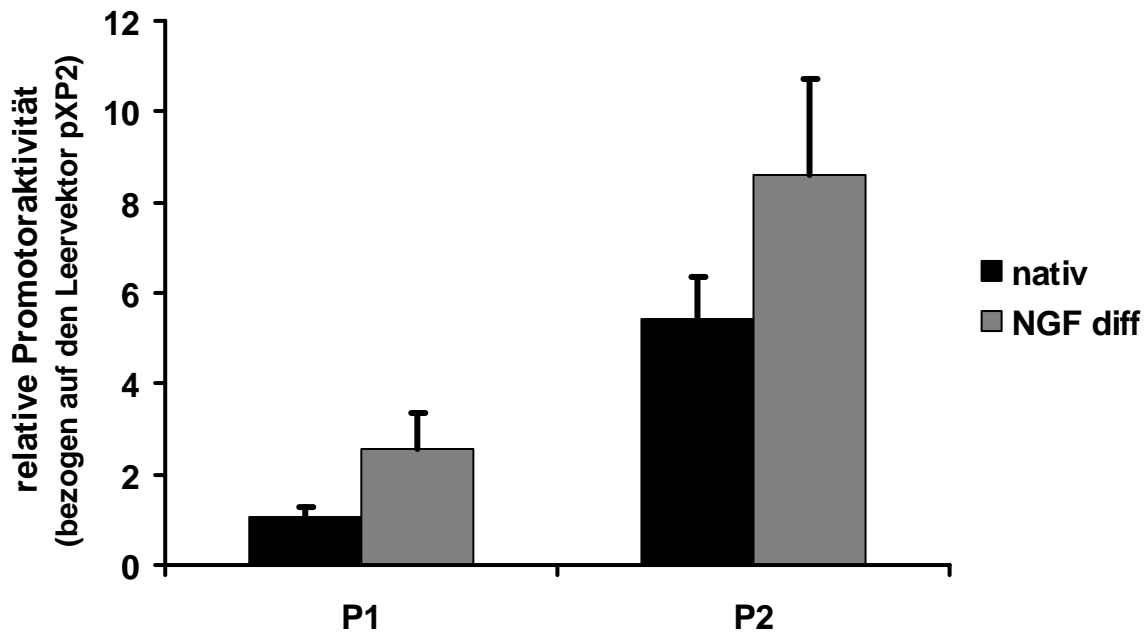


Abbildung 23: Abhängigkeit der Promotoraktivität der beiden Promotorbereiche vom Differenzierungsstadium der PC-12-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Luziferaseaktivität von HTR3B:P1 und HTR3B:P2 bezogen auf den Leervektor pXP2 in nicht differenzierten PC-12-Zellen (schwarze Balken). Die entsprechend in ausdifferenzierten PC-12-Zellen gemessenen Werte sind in grauen Balken dargestellt. Durch Differenzierung wurde die Promotoraktivität sowohl des P1 als auch des P2 Promotors verstärkt. Die Werte für die differenzierten PC-12-Zellen setzten sich zusammen aus insgesamt 4 Messungen an zwei verschiedenen Versuchstagen (4:2).

3.4 Regulation der Expression von *Htr3b*/HTR3B durch Hormone, Zytokine und Arzneistoffe

Im Zellversuch wurde der Effekt von potentiell die Expression von *Htr3b* beeinflussenden Substanzen mittels qRT-PCR untersucht. Dazu wurden das Glukokortikoid Dexamethason, der 5-HT₃-Rezeptorantagonist Tropisetron, der 5-HT₃-Rezeptoragonist 1-(m-Chlorophenyl)-biguanide (mCPBG), 17- α -Ethinylestradiol als Östrogen und Interleukin-1 β ausgewählt, da diese Substanzen potentiell einen Effekt auf die *Htr3b*-Genregulation haben könnten. Die endogen *Htr3b* exprimierenden Rattenzellen PC-12 wurden adhärent auf 12-Well Platten wachsen gelassen und dann 6 Tage lang mit NGF ausdifferenziert. Am 6. Tag wurden die oben erwähnten Substanzen für 8 h dem Medium zugesetzt [Konzentrationen siehe Tabelle 9]. Es wurde die endogene *Htr3b*-Expression im Vergleich zu nicht behandelten Zellen gemessen [Tabelle 9].

Nur die Zugabe von Dexamethason verursachte einen 4-fachen Anstieg der Expression von *Htr3b* in den Ratten-Zellen PC-12. Alle anderen Substanzen zeigten gegenüber den Zellen, die nur mit NGF differenziert waren, keinen Unterschied in der Expression von *Htr3b*.

Tabelle 9: Abhängigkeit der HTR3B-Expression von Hormonen und Arzneistoffen: Aufgelistet ist der Einfluss auf die Htr3b-Expression in PC-12-Zellen, die nach 6 Tagen Ausdifferenzierung mit NGF für 8 h, mit verschiedenen Substanzen inkubiert wurden. Die Genexpression wurde mittels qRT-PCR bestimmt und alle Werte wurden auf die Expression von 18S normalisiert.

Substanz	Stoffgruppe	Endkonzentration in der Zellkultur	Htr3b-Expression im Vergleich zu differenzierten Zellen + (erhöht)/ - (nicht erhöht)
Dexamethason	Glukokortikoid	1 μ M	+
Tropisetron	5HT ₃ R- Antagonist	1 μ M	-
mCPBG	5HT ₃ R-Agonist	1 μ M	-
17-α- Ethinylestradiol	Östrogen	2 nM	-
Interleukin 1β	Interleukin	1 μ M	-

Aufgrund dieses Befundes wurde die Induktion der Htr3b-Expression in PC-12-Zellen durch Dexamethason genauer untersucht. In Abbildung 24 wird die relative Expression von Htr3b, zum Vergleich auch Htr3a, in Abhängigkeit von der Dexamethason-Konzentration gezeigt. Es zeigte sich, dass nicht differenzierte adhärent gewachsene Zellen schon durch Inkubation mit Dexamethason in einer Konzentration von 0,01 μ M eine 3-fach erhöhte Expression von Htr3b aufwiesen. Eine weitere Erhöhung der Dexamethasonkonzentration auf bis zu 10 μ M zeigte keinen weiteren Anstieg in der Expression. In nicht dargestellten Versuchen zeigte sich auch bei 20 μ M Konzentration kein weiterer Anstieg der Expression. Bei Konzentrationen von 100 μ M Dexamethason starben die Zellen. Wie in der Abbildung zu sehen, zeigte sich im Gegensatz zur Htr3b-Expression keine Veränderung der Htr3a-Expression durch Zugabe des Glukokortikoids.

Auch bei 3 und 7 Tage lang ausdifferenzierten PC-12-Zellen konnte eine ähnliche Zunahme an Htr3b-Genexpression gesehen werden (Daten nicht gezeigt).

Die Inkubation humaner Lan-1-Zellen über 8 h mit Dexamethason in den Konzentrationen 0,1, 1 und 10 μ M zeigte keinen Anstieg der HTR3B-Expression. Es konnte also keine Assoziation der HTR3B-Expression in Lan-1-Zellen mit Dexamethason gesehen werden [Abbildung 25].

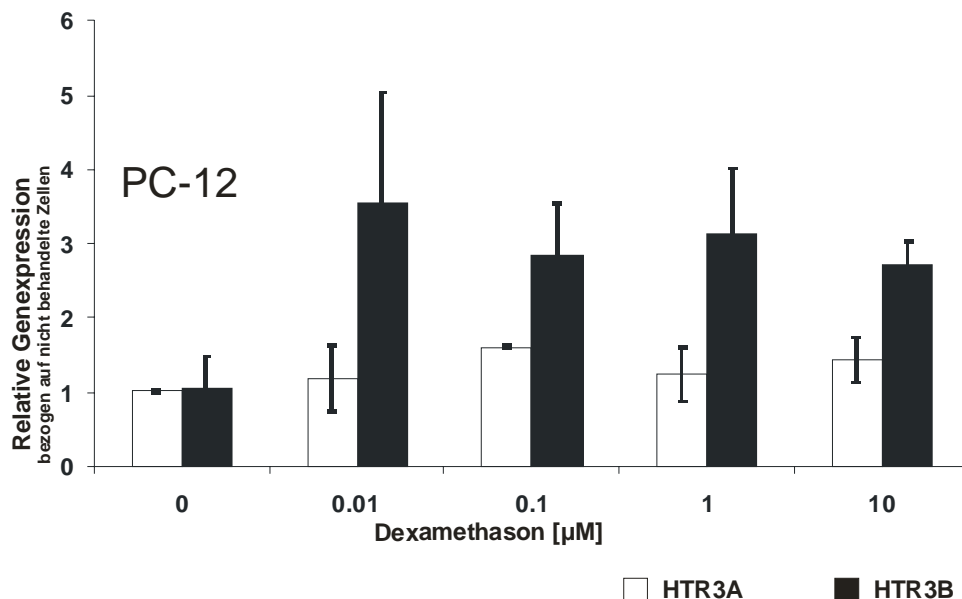


Abbildung 24: Relative Genexpression in PC-12-Zellen in Abhängigkeit von der Dexamethasonkonzentration: Adhärenz gewachsenen PC-12-Zellen wurden in je 2 Wells über 8 h mit Dexamethason in den Konzentrationen 0; 0,01; 0,1; 1 und 10 μM inkubiert. Es wurde mit qRT-PCR die Expression von Htr3a und Htr3b ermittelt. Dargestellt sind die relativen Genexpressionsmengen bezogen auf nicht behandelte Zellen und die Standardabweichungen aus 3-fach Messungen. Die Htr3a-Expression ändert sich nicht durch Zugabe von Dexamethason im Gegensatz zur Htr3b-Expression, die schon bei einer Konzentration von 0,01 μM mit 3- bis 4-fach höherer Expressionsrate, als in nicht behandelten Zellen gemessen auf die maximal induzierbare Höhe, angestiegen ist. Eine weitere Erhöhung der Dexamethasonkonzentration zeigte keine Änderung. Es wurden 2 unabhängige Versuche je in Triplikaten durchgeführt.

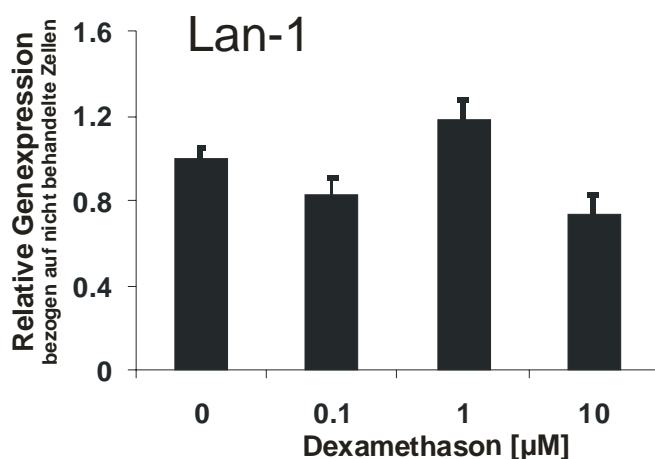


Abbildung 25: Endogene HTR3B-Expression in Lan-1-Zellen in Abhängigkeit von der Dexamethasonkonzentration. Durch Inkubation der Zellen mit Dexamethason der Konzentrationen 0,1, 1 und 10 μM über 8 h konnte in der qRT-PCR keine Veränderung der HTR3B-Expression detektiert werden. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 6-facher Messung (2 Versuche je 3 Ansätze) mit Standardabweichungen. Die Werte wurden mit TBP-Genexpressionswerten normalisiert.

3.5 Funktionelle Bedeutung des Deletionspolymorphismus

In Abschnitt 3.3.1 konnte gezeigt werden, dass das 2 kb Konstrukt von P1 im Luziferasevektor pXP2 in HEK293-Zellen eine Promotoraktivität hat. Hier wurde der Frage nachgegangen, ob die -100/-102 AAG Deletionsvariante (rs3831455), die mit klinischen Daten zur Häufigkeit vom Auftreten von Übelkeit und Erbrechen in Zusammenhang gebracht wird [52], einen Einfluss auf die Genexpression hat. Dazu wurden sowohl Messungen der Luziferaseaktivität als auch EMSA-Untersuchungen als auch bioinformatische Analysen durchgeführt.

3.5.1 Funktionelle Untersuchung des Deletionspolymorphismus mittels Luziferase-Reporter-Gen Versuch

Für diesen Versuch wurde das Konstrukt HTR3B:P1, welches das P1 Fragment im Luziferase-Reporter-Gen-Vektor pXP2 enthält, verwendet. Bei der Herstellung dieses Konstruktes diente als Matrize für die PCR die genomische DNA eines Patienten, der die -100/-102 AAG Deletionsvariante nicht aufwies. Nach dem gleichen Procedere wurde ein entsprechendes Konstrukt eines Patienten, bei dem die Deletionsvariante homozygot detektiert worden war, kloniert. Dieser Patient hatte klinisch ein häufigeres Erbrechen gegenüber den nicht die Deletion tragenden Patienten gezeigt. Zusätzlich zur Deletionsvariante trug dieser Patient eine weitere Variante innerhalb der 2 kb, die als rs3758987 C/T bekannt ist. Um auszuschließen, dass ein möglicherweise detektierter Effekt auf die zweite Variante rs3758987 C/T im Konstrukt zurückzuführen ist, wurde mit Hilfe der *Site-Directed Mutagenesis* zusätzlich ein nur die Deletionsvariante beinhaltendes Plasmid konstruiert. Als Ausgangskonstrukt dafür diente der pCR-XL-TOPO-Klon, der das 2 kb Fragment des Patienten, der keine der beiden Varianten aufwies, enthielt. Es wurde der pCR-XL-TOPO-Klon nicht der pXP2-Klon ausgewählt, da durch anschließendes Umklonieren eine potentielle Mutation im pXP2-Rückgrat durch das *Site-Directed Mutagenesis* Procedere ausgeschlossen werden konnte.

Je Konstrukt wurden 3 unabhängige Experimente (Ins/C) bzw. 2 unabhängige Experimente (Del/C und Del/T) durchgeführt, die je in Triplikaten in HEK293-Zellen transient transfiziert wurden. Abbildung 27 zeigt die Mittelwerte der Quotienten aus Firefly- und Renillaluziferase mit Standardabweichungen bezogen auf den Leervektor. Beide Varianten hatten keinen Einfluss auf die Promotoraktivität. Es zeigte sich also weder ein signifikanter Unterschied in

der Promotoraktivität in Abhängigkeit von der -100/-102 AAG Deletionsvariante rs3831455 noch von dem Einzelnukleotidpolymorphismus rs3758987 (Mann-Whitney-U Test).

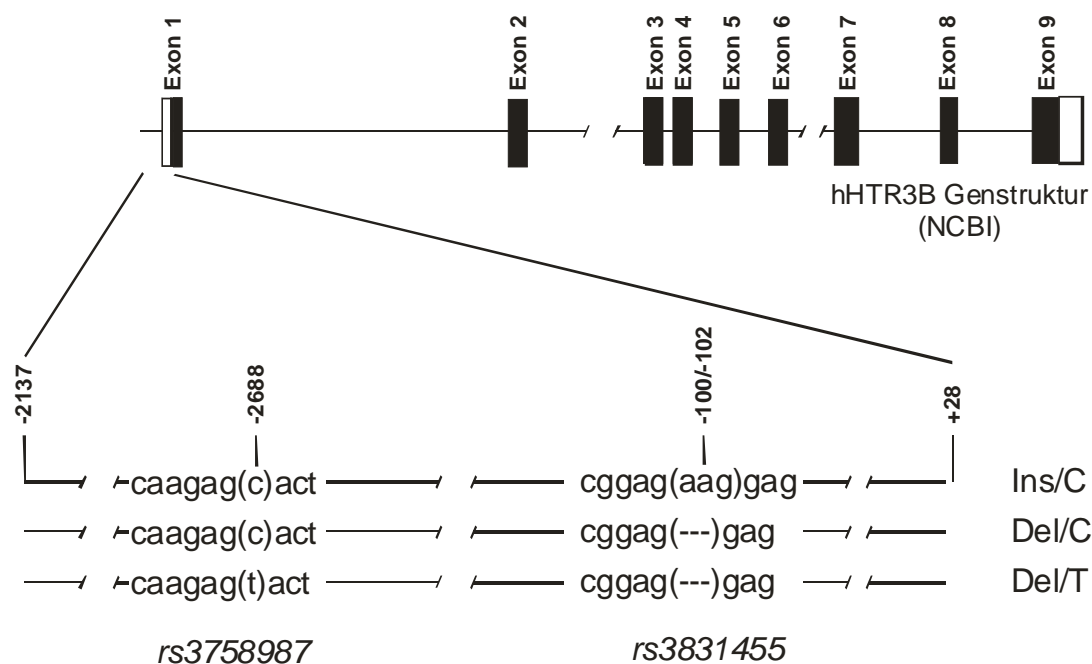


Abbildung 26: Übersicht über die Lokalisation der in der Reporteragen-Analyse untersuchten Varianten im HTR3B-Promotor-1.

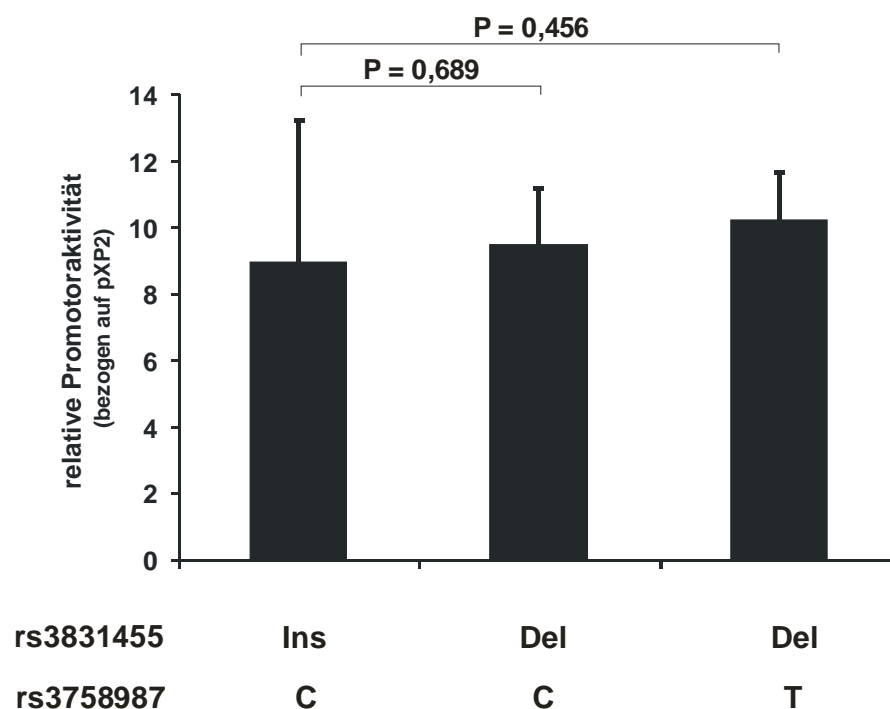


Abbildung 27: Vergleich von HTR3B:P1 Klonen mit und ohne die Polymorphismen transient transfiziert in HEK293-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Fireflyluziferase/Renillaluziferase-Quotienten mit Standardabweichungen aus 3 unabhängigen (Ins/C) bzw. 2 unabhängigen (Del/C und Del/T) Experimenten je dreifach transfiziert und gemessen. Der Mittelwert auf den Leervektor pXP2 bezogen. Die Unterschiede erwiesen sich im Mann-Whitney-U Test als nicht signifikant.

3.5.2 Tandemklonierung des Bereiches der Deletionsvariante

Die P1-Region hatte keine Promotoraktivität in HTR3B endogen exprimierenden Zellen gezeigt [3.3.1]. Da P1 also keine oder nur eine sehr schwache eigene Promotoraktivität hat, wurde, um überhaupt ein Ablesen zu initiieren, mit dem pG13Promotor-Luziferase-Reportergen-Konstrukt ein Vektor mit einem starken viralen Promotor ausgewählt. Die polymorphe Stelle mit und ohne Deletion wurde 3-fach hintereinander vor den SV40-Promotor dieses Vektors kloniert [Abbildung 28]. Diese 3-fache Wiederholung der polymorphen Sequenz sollte einen potentiellen Unterschied zwischen dem Wildtyp und dem Deletionspolymorphismus verstärken.

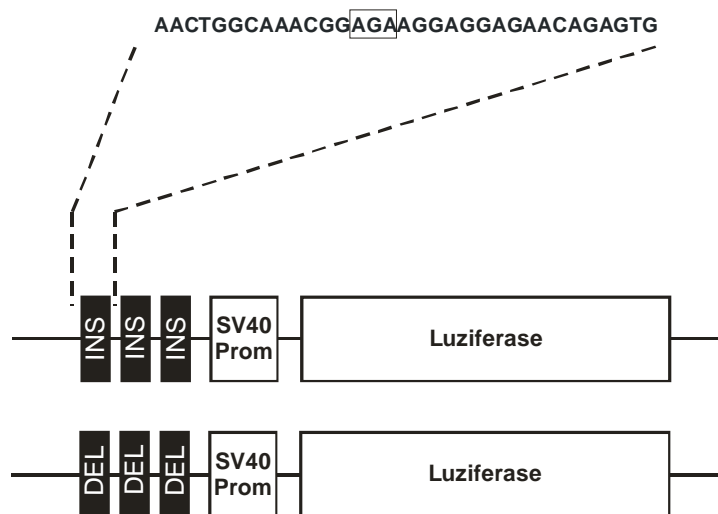


Abbildung 28: Schematische Darstellung der 3-fach Tandemklonierung eines Bereiches mit oder ohne Deletionspolymorphismus vor den SV40-Promotor des pG13Promotor-Luziferase-Reportergen-Vektors.

Es wurden je Konstrukt 2 genetisch identische Klone in PC-12-, CaCo-2- sowie in HEK293-Zellen transfiziert. Wie in Abbildung 29 gezeigt, konnte nur in CaCo-2-Zellen durch das 3-fach klonierte Fragment eine signifikante Steigerung der Promotoraktivität gesehen werden. Aus der Abbildung ist offenkundig, dass der Deletionspolymorphismus keine signifikante Änderung der Promotoraktivität mit sich brachte. Immerhin ist auch hier in CaCo-2- und PC-12-Zellen, wie schon in Abbildung 27, eine leicht höhere jedoch nicht signifikante Promotoraktivität für die Deletionsvariante erkennbar.

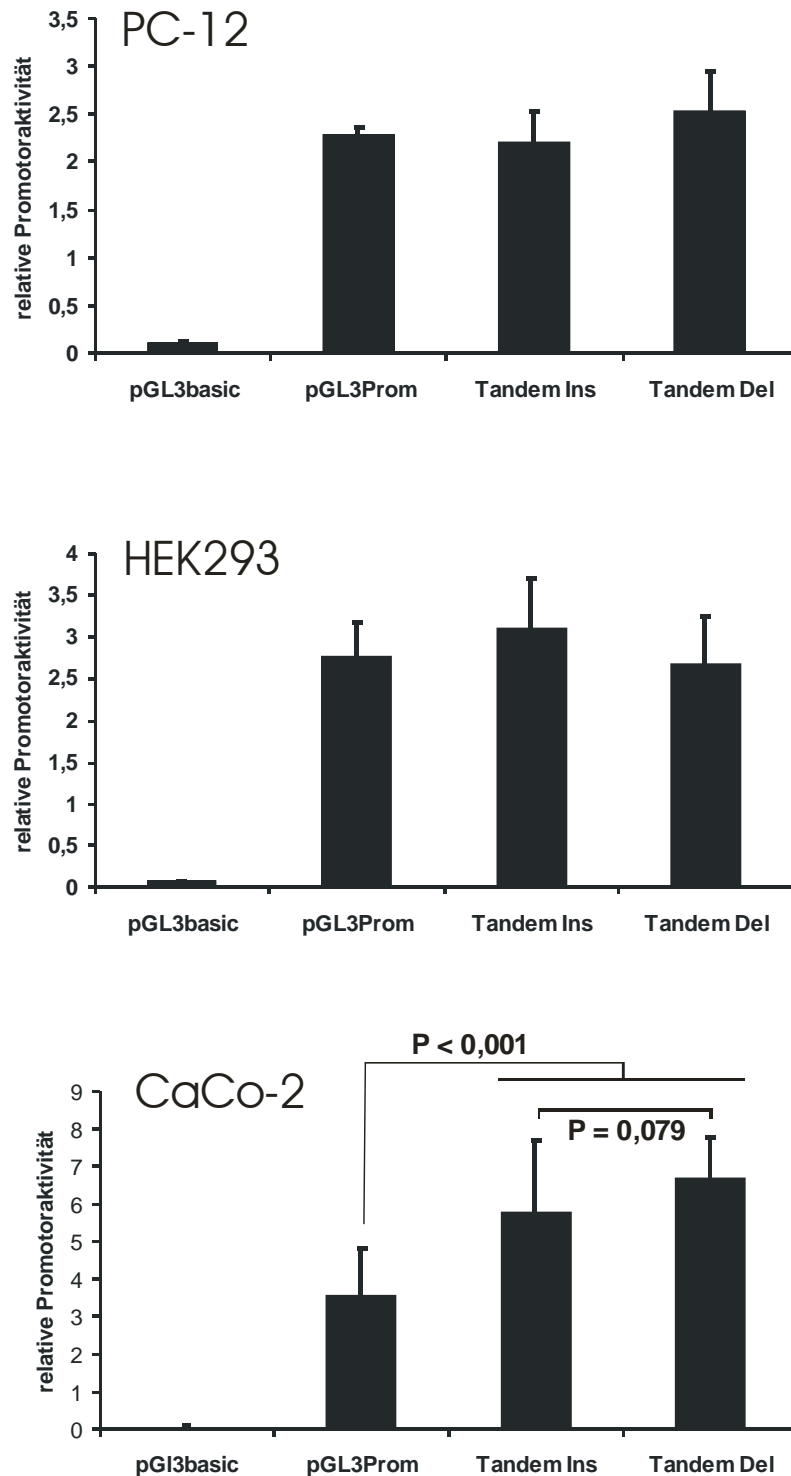


Abbildung 29: Transiente Transfektion von Konstrukten, die den Bereich der Deletionsvariante rs3831455 3-fach hintereinander kloniert vor dem SV40 Promotor des pGL3Promotor Vektors enthalten. Nur in CaCo-2-Zellen konnte eine signifikante Steigerung der Promotoraktivität durch das 3-fach klonierte Fragment detektiert werden, der allerdings, wie auch in den Zelllinien HEK293 und PC-12 beobachtet, unabhängig von der Deletionsvariante war. Zur statistischen Auswertung wurde der Mann-Whitney-U Test verwendet. Es sind die Quotienten aus Firefly/Renilla Luziferasewerten mit Standardabweichungen gezeigt. Je 2 genetisch identische Klone pro Konstrukt wurden je 3-fach transfiziert.

3.5.3 EMSA-Untersuchung

Durch *Electrophoretic-Mobility-Shift-Assays* (EMSA) wurde die Bindung von Proteinen in Abhängigkeit von den Varianten untersucht. Dazu wurde die Region der -100/-102 Deletionsvariante (rs3831455) und die Region des C/T-Einzelnukleotidaustausches (rs3758987) als Sonde verwendet. Die Sonde wurde mit ^{32}P markiert und mit Zellkernextrakten aus HEK293-Zellen und PC-12-Zellen inkubiert. Die Sonde wurde jeweils im Überschuss zugegeben, so dass allein die Zahl der gebundenen Proteine für die Bandenstärke limitierend war. Gebundene Proteine wurden im Gel durch Auflegen auf Röntgenfilm sichtbar gemacht. Als Positivkontrolle, dass das Procedere des EMSA funktioniert und dass die Zellkernproteine „intakt“ waren, wurde eine markierte Sonde mit der Sequenz des cAMP-responsive-Elements (CRE) jeweils der gleichen Prozedur unterzogen, da davon ausgegangen werden konnte, dass die CRE-DNA-Sonde in jedem Zellkern Proteine bindet.

Die Insertionssonde zeigte nach Inkubation mit dem PC-12-Zellkernextrakt sowie mit dem HEK293-Zellkernextrakt stärkere Banden als die Deletionssonde [Abbildung 30]. Die Bande für die Deletionssonde nach Inkubation mit PC-12-Zellkernextrakt betrug nur 88% der Bandenstärke wie sie für die Insertionssonde gefunden wurde. Im HEK293-Zellkernextrakt betrug die Intensität der *geshifteten* Sondenbande nur 74% verglichen mit der Insertionssonde. Die Inkubation der Sonde mit der C-Variante für rs3758987 versus der Sonde mit der T-Variante zeigte in beiden Zellkernextrakten eine schwache Bindung von Proteinen, die sich aber nicht in Abhängigkeit von der Variante unterschied (nicht gezeigte Daten).

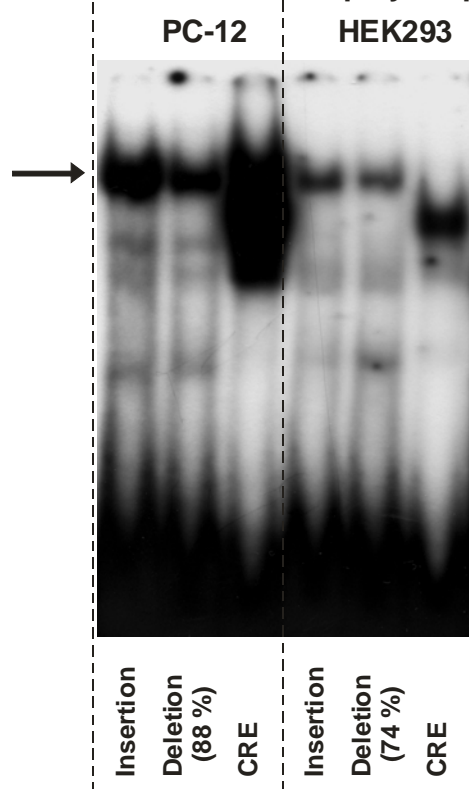
-100/-102 AAG Deletionspolymorphismus

Abbildung 30: EMSA der Insertionssonde versus Deletionssonde mit Zellkernextrakten aus PC-12- und HEK293-Zellen. Für PC-12- wie auch für HEK293-Zellkernextrakte konnte eine stärkere Bindung eines unbekannten Proteins an die Insertionssonde detektiert werden als für die Deletionssonde. Der Versuch wurde mehrfach wiederholt. Die Quantifizierung der Bandenstärke bezieht sich jedoch nur auf das gezeigte Gel. Hier ergab sich, dass die Deletionsbande für den PC-12 Zellkernextrakt 88% der Pixelzahl der Insertionsbande betrug, die Pixelzahl der Deletionsbande für HEK293 betrug bezogen auf die Insertionsbande 74%. Eine markierte Sonde für das cAMP-responsiv-Element (CRE) wurde jeweils als Positivkontrolle für das EMSA-Verfahren eingesetzt.

Um der Spezifität bzw. Affinität der detektierten Banden nachzugehen, wurde ein Wettbewerbsversuch unternommen. Dazu wurde die radioaktiv markierte Insertionssonde durch die Zugabe von unterschiedlichen Mengen an nicht markierter (kalter) Insertions- bzw. kalter Deletions-Sonde während der Inkubation mit den Zellkernextrakten von der Bindungsstelle am Protein verdrängt. Bei einer erfolgreichen Verdrängung der radioaktiven Sonde durch die kalte Sonde, war eine Abschwächung der radioaktiven Bande zu erwarten. Die hier durchgeführte kompetitive Verdrängung der radioaktiven Sonde an der Proteinbindungsstelle wurde mit 30-fachem, 100-fachem, 300-fachem und 1000-fachem Überschuss an kalter Sonde durchgeführt. Es zeigte sich, dass sich die radioaktive Insertionssonde schon in niedrigen Konzentrationen stärker von der kalten Insertionssonde an der Proteinbindungsstelle verdrängen ließ als von der kalten Deletionssonde [Abbildung 32]. Die Konkurrenz mit der kalten CRE-Sonde, die das Protein nicht bindet, zeigt den Einfluss

von beliebigen DNA-Stücken, die durch ihren großen Überschuss die Bindung des Proteins an die Sonde geringfügig reduzierten (= Negativkontrolle, im Idealfall würde die CRE-Sonde gar keinen Effekt auf die Bandenstärke zeigen).

Um auszuschließen, dass die Bindung des Proteins am Ende der Sonde nicht am polymorphen Zentrum stattfindet, wurde zusätzlich zur Konkurrenz mit der Originalsonde der gleiche Versuch auch mit einer um 7 Basenpaare am 3'-Ende verkürzten Sonde durchgeführt. Die kalte Konkurrenz der verkürzten radioaktiv markierten Insertionssonde mit verkürzten kalten Insertion- bzw. Deletions-DNA-Sonden ergab das gleiche Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren wurde in einem Versuch die radioaktiv markierte Deletionssonde mit 30fachem bis 1000-fachem Überschuss an kalter Insertions- und Deletionssonde verdrängt. Die Banden waren sehr schwach, es konnte aber dieselbe Tendenz wie in Abbildung 32 gezeigt beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

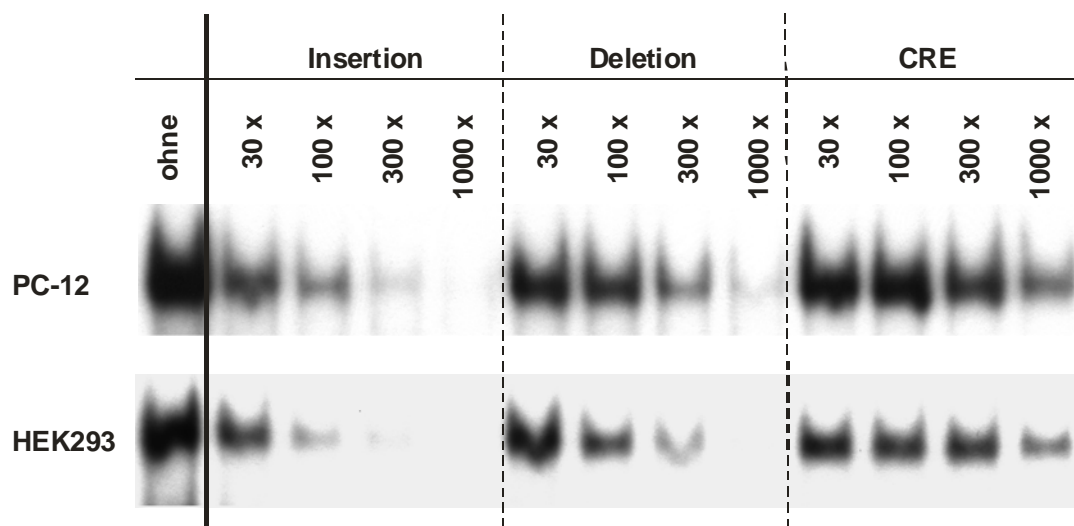


Abbildung 31: Konkurrenz der mit ^{32}P -markierten Insertionssonde mit kalter DNA-Sonde mit oder ohne Deletionsvariante in unterschiedlichen Konzentrationen (30-fach – 1000-fach molarer Überschuss gegenüber der markierten Sonde). Die Tatsache, dass die Banden durch Zugabe von kalter Insertionssonde schneller verblassen als nach Zugabe von kalter Deletionssonde der gleichen Konzentration, zeigt, dass die Insertionssonde die markierte Sonde stärker von der Proteinbindungsstelle verdrängt als die Deletionssonde. Die Zugabe von nicht bindender kalter CRE-Sonde zeigt nur einen minimalen Einfluss der zugegebenen DNA.

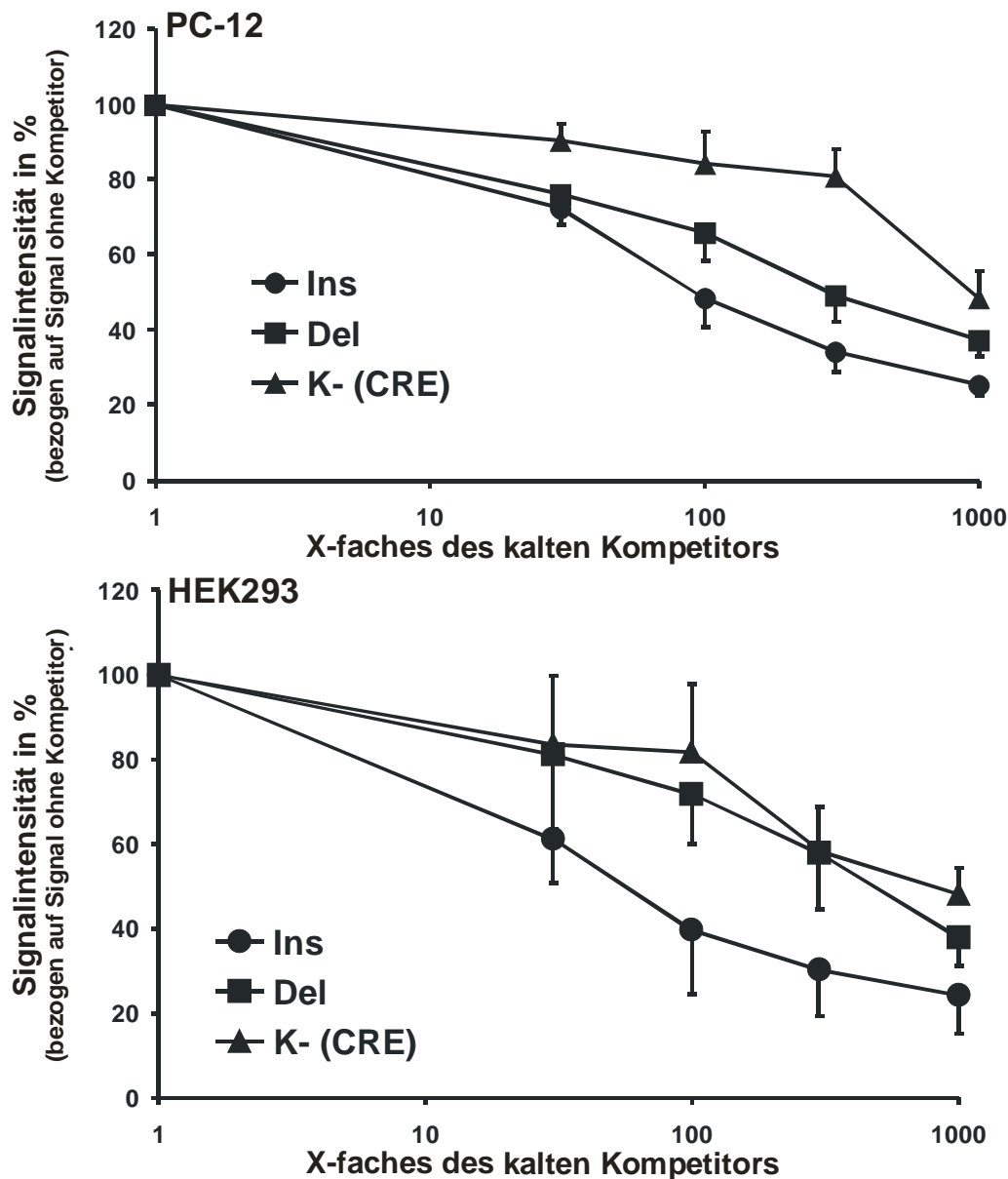


Abbildung 32: Quantitative Auswertung aller Kompetitions-Gelshifts, wie sie exemplarisch in Abbildung 31 dargestellt sind. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen dreier verschiedener Gelshifts gezeigt.

Es wurde bis hierher gezeigt, dass die DNA-Sonden der Region der Deletionsvariante Zellkernproteine binden und dass die Bindungsstärke abhängig ist von dem Deletionspolymorphismus. Um den Einfluss der Variante zu verifizieren, wurden Sonden generiert, die jeweils 3-Basenpaar-Deletionen an unterschiedlichen Stellen aufwiesen. Diese Sonden wurden radioaktiv mit ^{32}P markiert und mit den Zellkernproteinen der PC-12- sowie der HEK293-Zellen inkubiert.

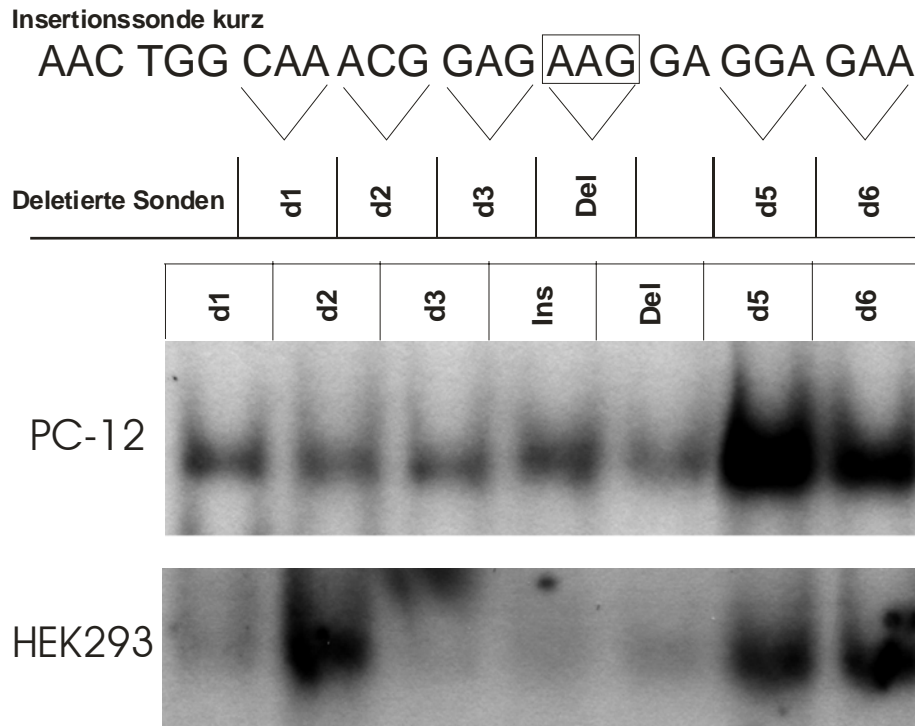


Abbildung 33: Gelshift mit ^{32}P -markierten DNA-Sonden, die im Vergleich zu der Insertionssonde (Ins) an den oben gezeigten Stellen eine Deletion von 3 Basenpaaren haben. Die mit „Del“ bezeichnete Sonde zeigt die in der Natur vorkommende Deletionsvariante rs3831455. Die Sonden, die am 3' Ende verkürzt waren, d5 und d6, zeigten die stärkste Bindung, bei der Inkubation mit HEK293-Zellkernextrakt zusätzlich auch d2. Die Insertionssonde zeigte im Gegensatz zu allen anderen Experimenten an HEK293-Zellen nur in diesem Experiment nicht wie sonst eine stärkere Bande als die Deletionssonde.

Überraschenderweise zeigte sich die stärkste Bindung nicht wie erwartet für die Insertionssonde, sondern für die 3'-verkürzten Sonden d5 und d6 und bei den HEK293-Zellen sogar zusätzlich auch für die d2-Sonde. Dieses Ergebnis bestätigte, dass aus dem Proteinextrakt ein Protein oder ein Proteinkomplex gebunden wird. Des Weiteren ergaben sich daraus neue Denkanstöße zur kritischen Interpretation der in Abbildung 30 und Abbildung 32 gezeigten Ergebnisse.

Der wichtigen Frage, welches Protein an die polymorphe Stelle bindet, wurde zunächst mittels bioinformatischer Analyse der Sondensequenz in der TESS-Datenbank nachgegangen. Die Ergebnisse der Analyse für die Insertionssonde sind in Tabelle 10 aufgelistet. Für die Deletionssonde ergab sich das identische Ergebnis mit Ausnahme vom *Ets-family* Protein PU.1, das laut der TESS-Datenbank nicht an die Deletionssonde bindet wohl aber an die Insertionssonde.

Tabelle 10: Ergebnis der Suche auf potentiell bindende Proteine in der TESS-Datenbank

Potentiell bindende Proteine	Insertionssonde	Deletionssonde
c-Myc	+	+
c-Myb	+	+
PU.1	+	bindet nicht
PPUR	+	+
Progesteronrezeptor	+	+
Glukokortikoidrezeptor	+	+
Myogenin	+	+

Aufgrund dieser Analyse wurde eine kalte DNA-Sonde mit der Konsensussequenz von PU.1 sowie zum Vergleich die kalten DNA-Sonden der Proteine Glukortikoidrezeptor (GR), Progesteronrezeptor (PR), cMyb und cMyc als Kompetitoren in 300-fachem Überschuss im EMSA Versuch mit der radioaktiv markierten Insertionssonde eingesetzt. Es wurde der HEK293-Zellkernproteinextrakt verwendet.

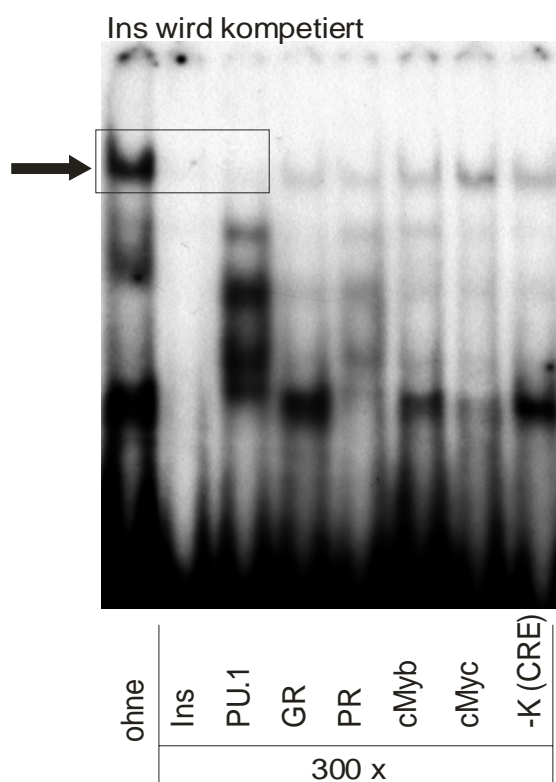


Abbildung 34: Konkurrenz der radioaktiven Insertionssonde mit 300-fachem Überschuss an kalten Konsensus-DNA-Sonden potentiell bindender Proteine, die durch die TESS-Datenbankanalyse gefunden wurden. Die Bande im *Shift* wurde nur durch Konkurrenz mit sich selbst und mit der Konsensus-DNA-Sonde von PU.1 komplett verdrängt. PU.1 war somit das Kandidatenprotein für die Bindung an der Insertionssonde.

Die Zugabe von 300-facher Menge an PU.1 DNA-Sonde zeigte eine komplette Verdrängung der Banden im Gel. Für alle anderen Sonden wurde keine komplette Verdrängung der Bande beobachtet [Abbildung 34].

Die in der Referenzliteratur der TESS-Datenbank beschriebene Konsensussequenz für PU.1 mit der Basenabfolge GGAAC [83] bindet theoretisch selektiv an die Sequenz des HTR3B-Gens im Bereich der Deletionsvariante. Bei weiteren Literaturrecherchen fanden sich keine weiteren Publikationen mit dieser Basenabfolge für PU.1. Es wurde einheitlich eine Konsensussequenz für die Ets-Familie, zu der auch PU.1 zählt, mit der Basenabfolge AAGGA geschrieben. Diese ist der Sequenz der Insertionssonde wie ein Spiegel. Nach dieser allgemein bekannten Sequenz könnte theoretisch weder PU.1 noch andere Vertreter der Ets-Familie an die Insertionssonde binden. Da die Ergebnisse soweit jedoch eine Änderung in der Bindung im Gelshift zeigten, wurde PU.1 als potentiell bindendes Protein weiter untersucht. Zunächst wurde die Insertions-Konsensus DNA-Sonde mit ^{32}P markiert und in Konzentrationen von 30-fachem, 100-fachem, 300-fachem und 1000-fachem Überschuss an kalter Sonde mit sich selbst sowie mit diesen Mengen an kalter PU.1-Sonde kompetiert. Es zeigte sich eine bessere Verdrängung der radioaktiven Insertionssonde mit sich selbst als mit PU.1 [Abbildung 35A]. Im umgekehrten Versuch, bei dem die PU.1 Konsensus-DNA-Sonde mit ^{32}P markiert und in Konzentrationen von 100-fachem, 300-fachem und 1000-fachem Überschuss an kalter Sonde mit sich selbst sowie mit diesen Mengen an kalter Insertionssonde kompetiert wurde, zeigte sich eine Verdrängung der radioaktiven PU.1-Sonde von der Bindungsstelle am Protein ausschließlich durch Zugabe der kalten PU.1 Sonde nicht aber durch die kalte Insertionssonde [Abbildung 35B].

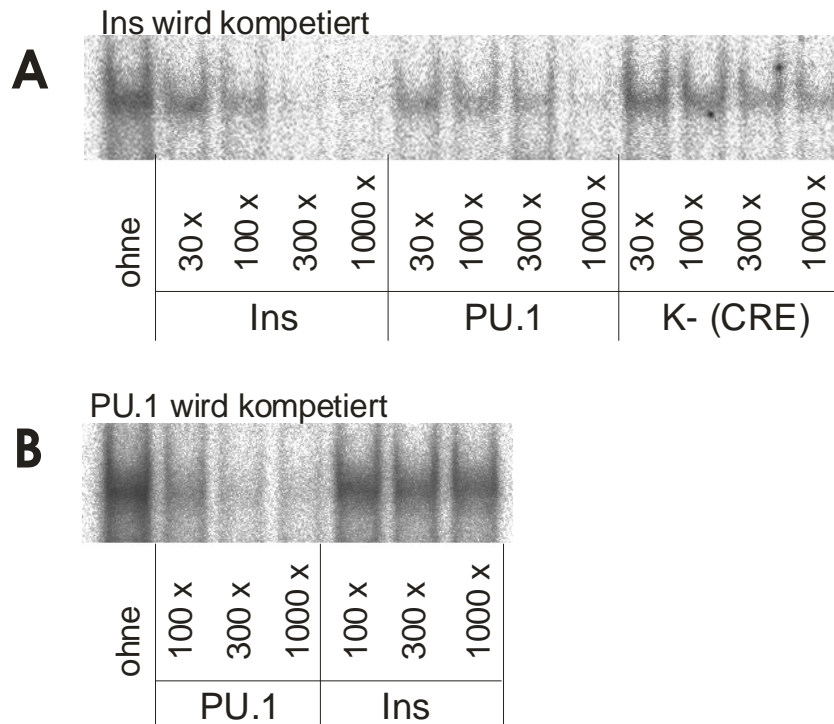


Abbildung 35: A) Konkurrenz der mit ^{32}P -markierten Insertions-DNA-Sonde mit kalter Insertionssonde und mit PU.1 Konsensus-DNA-Sonde in unterschiedlichen Konzentrationen der kalten Sonde. B) Konkurrenz der mit ^{32}P -markierten PU.1 Konsensus-DNA-Sonde mit sich selbst in verschiedenen Konzentrationen und mit der kalten Insertionssonde dargestellt. Es zeigte sich, dass die Insertionssonde nicht die PU.1-Sonde von der Bindungsstelle am Protein verdrängen konnte.

Um die Bindung von Vertretern der Ets-Familie an die Insertionssonde endgültig auszuschließen, wurden Konsensus-DNA-Sonden, die für ganze Gruppe von Ets-Familienmitgliedern gelten (Sequenzen Santa Cruz Biotechnology „Ets-1/Pea3“ #sc2555 und #sc2556 und „Ets-family gel shift“ #sc2549 und sc#2550) mit oder ohne Mutation der GGAAG-Stelle, in 30-fachem bis 1000-fachem Überschuss im Konkurrenzversuch eingesetzt, um die radioaktiv markierte Insertionssonde von der Bindungsstelle zu verdrängen. Es zeigte sich kein Einfluss der Konkurrenten auf die Bindungsstärke der radioaktiven Sonde (Daten nicht gezeigt). Welches Protein bindet, konnte damit nicht eindeutig nachgewiesen werden.

3.6 Ergänzende Bioinformatische Analysen

3.6.1 Bioinformatische Analysen zu Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen

Unter Verwendung der Datenbank BIOBASE TRANSFAC [82] wurden bioinformatische Untersuchungen der kompletten Promotorregion 1 und 2 auf mögliche Transkriptionsbindungsfaktoren durchgeführt. Hierzu wurde zunächst die allgemeine Matrixsuche

(Match™) für Nervensystem-spezifische Transkriptionsfaktoren in Wirbeltieren verwendet. Durch die Voreinstellung „Minimierung falsch positiver Ergebnisse“ wurden nur relativ sichere Bindungskandidaten aufgezeigt. Die Ergebnisse wurden für P1 und P2 in Abbildung 36 dargestellt. Für P1 fanden sich als sichere Transkriptionsfaktor-Bindestellen nur diejenigen für NFkappaB und *PBX/knotted 1 homeobox* (PBX), für P2 fiel auf, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit häufig das *paired box gene 6* (PAX6) bindet, außerdem wurde eine Bindungsstelle für den Estradiol-Rezeptor (ER) und die Faktoren *chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor* (COUPTF) und *heart and neural crest derivatives expressed 1* (HAND1E47) gefunden.

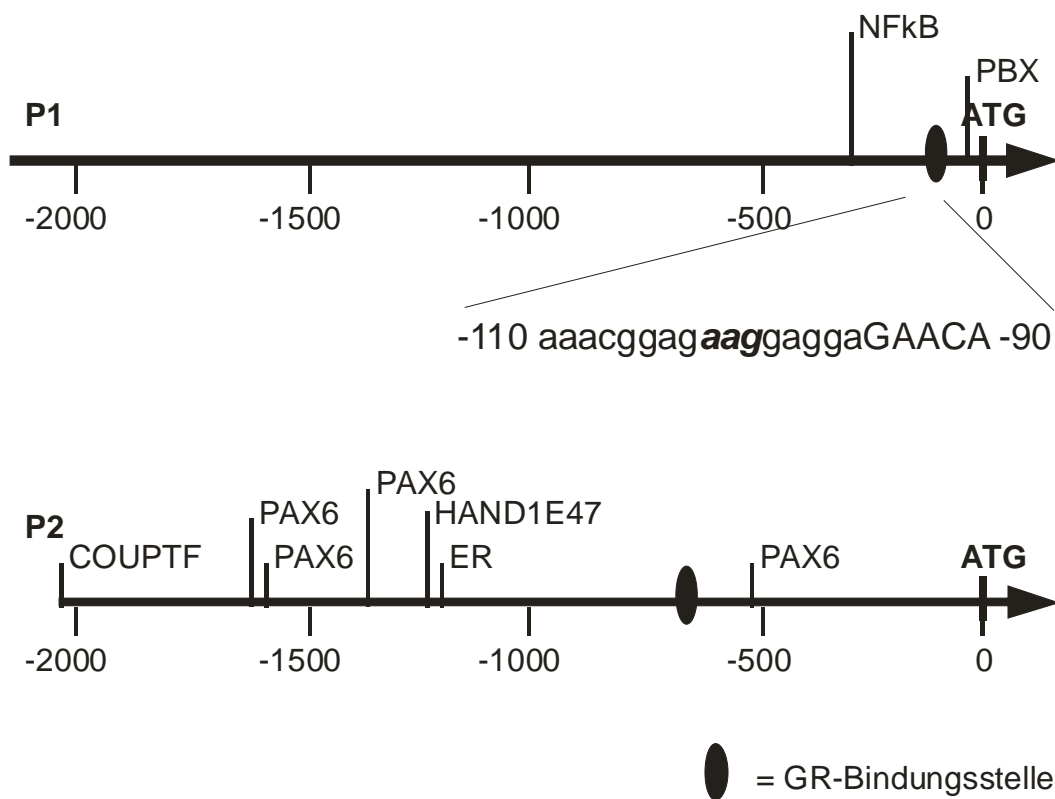


Abbildung 36: Analyse des Promotor-1 (P1) und Promotor-2 (P2) Fragmentes auf mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Eine sehr restriktive Analyse (Voreinstellung: Minimierung falsch positiver Ergebnisse) hat im MATCH™ der TRANSFAC-Datenbank für P1 die Transkriptionsfaktoren NFkappaB und PBX detektiert. Für P2 wurden erstaunlich viele Bindungsstellen für den Faktor PAX6 detektiert und je eine Bindungsstelle für COUPTF, HAND1E47 und den Estradiolrezeptor aufgeführt. Eine weitere bioinformatische Untersuchung zum Auffinden von Glukokortikoidrezeptorbindungsstellen wurde mit der Voreinstellung „Minimierung falsch negativer Ergebnisse“ durchgeführt, um alle denkbaren Bindungsstellen zu detektieren. Die gefundenen Bindungsstellen für den Glukokortikoidrezeptor befanden sich für das P1-Segment in unmittelbarer Nähe der -100/-102 Deletionsvariante (siehe vergrößerten Bereich; Großbuchstaben signalisieren die Bindungsstelle) für P2 im Bereich -670/-674.

Angeichts der gesteigerten Expression von Htr3b nach Zugabe von Dexamethason [siehe Abschnitt 3.4] wurde in einer weiteren bioinformatischen Untersuchung in der menschlichen

Sequenz nach allen denkbaren Bindungsstellen (durch Minimierung falsch negativer Ergebnisse) für den Glukokortikoid-Rezeptor (GR) gesucht. Es wurde interessanterweise für P1 an der Position -90/-94, bezogen auf das ATG-1 Startkodon, eine Bindungsstelle für den Glukokortikoidrezeptor detektiert. Dieser liegt in unmittelbarer Nähe der untersuchten -100/-102 Deletionsvariante. Für P2 wurde eine mögliche Glukokortikoidrezeptor-Bindungsstelle an der Position -670/-674 gefunden. Die potentiellen Bindungsstellen für den Glukokortikoidrezeptor sind in Abbildung 36 mit schwarzen Elipsen gekennzeichnet. Die -100/-102 Deletionsvariante im Promotorbereich P1 beeinflusste das Ergebnis der bioinformatischen Untersuchungen nicht.

Des Weiteren wurde die Ratten gDNA Promotor Sequenz (GI62750808 Nukleotide 52197533 bis 52198532 siehe Anhang) auf potentielle GR-Bindungsstellen untersucht. Es fanden sich potentielle Bindungsstellen für den Glukokortikoidrezeptor. Zudem fanden sich sowohl Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NFkappaB und PBX, wie sie beim Menschen im P1 Bereich gefunden wurden, sowie Bindungsstellen für die Faktoren PAX6, COUPTF und HAND1, die im menschlichen P2 Bereich gefunden wurden.

3.6.2 Genetische Kopplung

Für die -100/-102 Deletionsvariante konnte also weder durch Luziferaseuntersuchungen [3.5.1, 3.5.2] noch durch EMSAs [3.5.3] eine eindeutige Funktionalität der Variante gezeigt werden. Aus diesem Grund schien eine Analyse auf mögliche Verknüpfung (*linkage*) dieser Variante mit anderen benachbarten Polymorphismen sinnvoll. Sollte sich die Deletionsvariante in einem Bereich befinden, in dem ein hohes *linkage disequilibrium* (LD = Varianten werden häufiger als zufällig gemeinsam vererbt) vorherrscht, so könnte eine der Varianten in dem entsprechenden Haplotyp funktionell sein und sich die klinische Relevanz, die sich für die Deletionsvariante gezeigt hat, dadurch erklären. Es wurde dafür die Region des HTR3A- und HTR3B-Gens auf Chromosom 11 auf gekoppelte Bereiche untersucht (gi:51468697 Position113252914-113381063) [Abbildung 37]. Derartige sehr umfassende Untersuchungen sind seit Ende 2005 durch das weltweite HapMap Projekt [55] möglich geworden. Hier wurde unter anderem die DNA von 90 US-amerikanischen Kaukasiern in vielen Millionen Polymorphismen genotypisiert und die Daten im Netz zugänglich gemacht [53]. Nach der Analyse der Daten nach Gabriel et al. [76] modifiziert (siehe zu Einstellung und Begrifflichkeiten Abschnitt 2.3) zeigten sich zwei getrennte Bereiche in denen ein hohes LD vorliegt, was durch eine Häufung von dunkelroten Feldern angezeigt wird [Abbildung

37]. Sie trennen den Bereich des HTR3B-Gens von dem Bereich des HTR3A-Gens in zwei relativ unabhängige Haplotypenblöcke. Die -100/-102 Deletionsvariante ist im Haplotypblock des HTR3B-Gens lokalisiert. Die Variante selbst wurde nicht im HapMap Projekt genotypisiert. Die Position der Deletionsvariante wurde in Abbildung 37 mit einem Pfeil markiert.

Die Genotypisierungsdaten der Patienten aus der Studie von Trembley et al. [52] wurden ebenso wie die HapMap-Daten mittels der Haploview-Analyse ausgewertet. Dabei fanden sich 11 mögliche Haplotypen, von denen nur einer die Deletionsvariante aufwies. Drei der Varianten, die für diese Studie bestimmt worden waren, waren ebenfalls im HapMap Projekt genotypisiert worden. Aufgrund der Kenntnis über diese drei Varianten konnte der vermutlich die Funktion tragende Haplotyp auf vier Kandidatenhaplotypen eingegrenzt werden (in Abbildung 38 mit Pfeilen markiert). Die mit Elipsen markierten Varianten könnten in weiteren Analysen zur Diskriminierung zwischen den vier möglichen Haplotypen dienen.

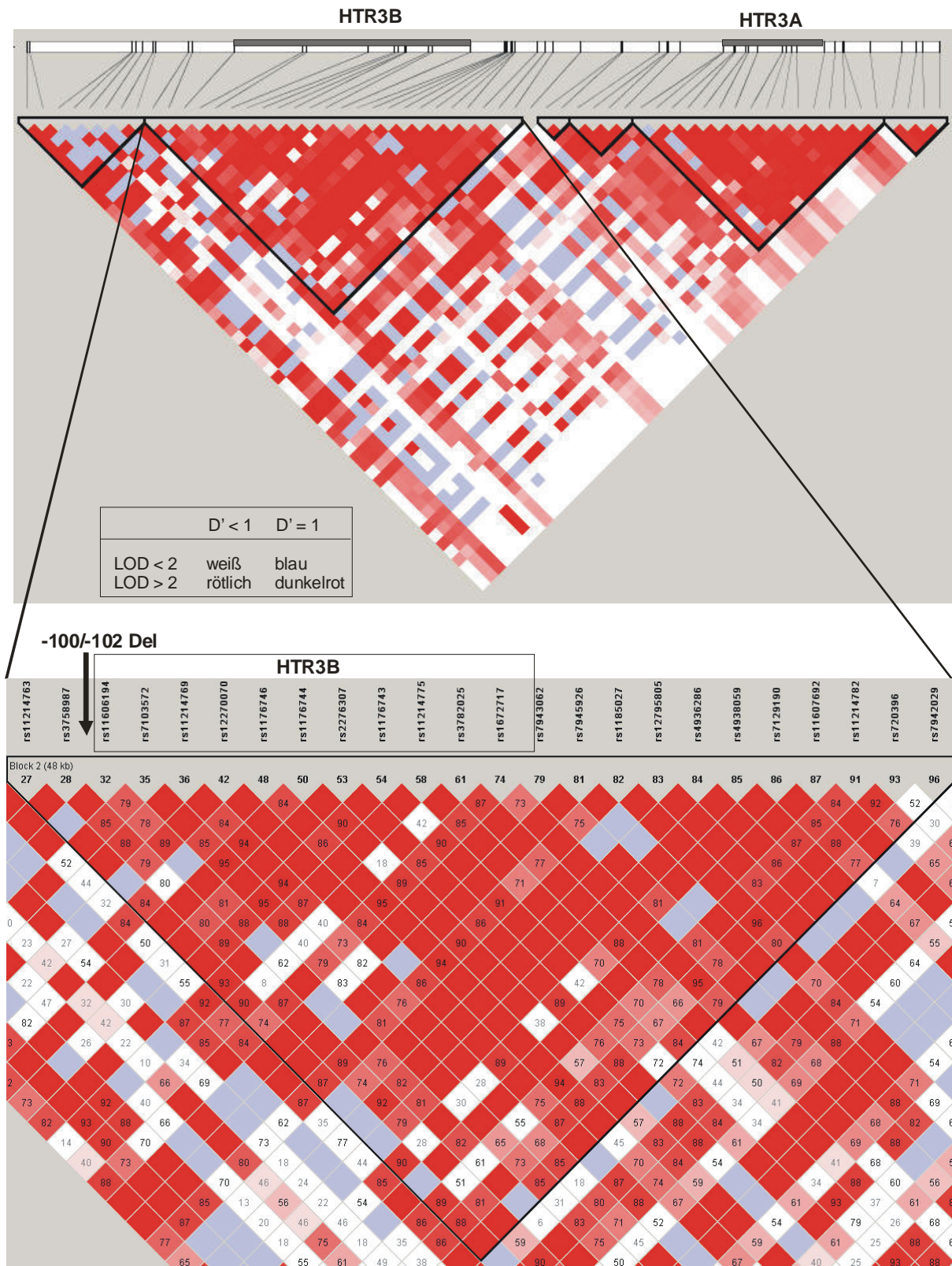


Abbildung 37: Auswertung der HapMap-Daten für US-amerikanische Kaukasier auf *linkage disequilibrium* nach Gabriel et al. modifiziert. Die Felder, die sich jeweils für 2 Varianten ergeben sind angefärbt relativ zur Stärke des *linkage disequilibrium*s (dunkelrot = hohes *linkage disequilibrium*). Das LD wird ermittelt aus zwei Parametern, dem D' Wert und den Konfidenzgrenzen für D' . Die Zahlen in den Zellen repräsentieren den D' Wert (multipliziert mit Faktor 100), leere Zellen bedeuten $D' = 1$, LOD = Logarithmus des Odds Ratios der Likelihood. Die Position der -100/-102 Deletionsvariante wurde mit einem Pfeil markiert (Zu Begrifflichkeiten siehe 2.3).

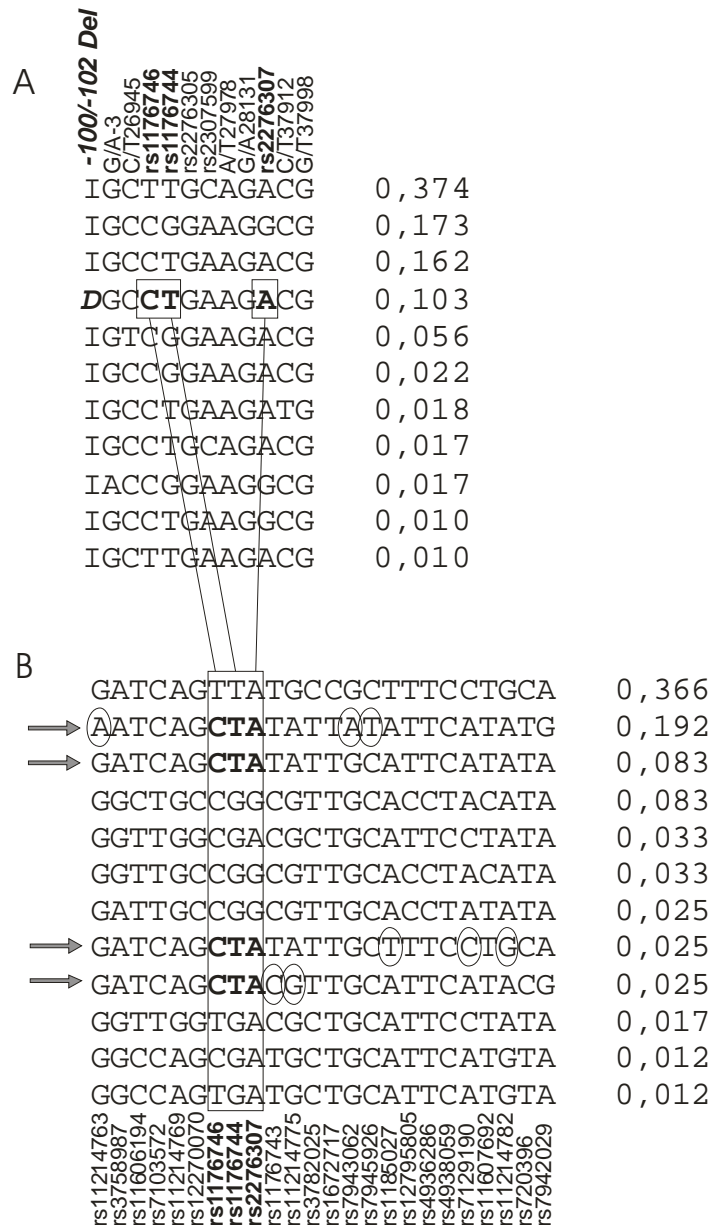


Abbildung 38: Dargestellt sind die Haplotypenblöcke, die anhand der Haploview-Daten generiert wurden. A) Anhand der Genotypisierungsdaten aus der Studie von Trembley et al. [52] konnten 11 Haplotypenblöcke generiert werden. Nur ein Haplotyp zeigte die klinisch als relevant gefundene Deletionsvariante. Drei Varianten wurden sowohl in dem HapMap-Probandenkollektiv wie auch in dem Patientenkollektiv der Studie bestimmt. B) Von den 12 möglichen Haplotypen der HapMap-Daten enthalten, nach dem Vergleich der Ergebnisse für das Patientenkollektiv, vermutlich nur vier Haplotypen die Deletionsvariante. Diese Haplotypen wurden mit grauen Pfeilen markiert. In weiteren Genotypisierungen könnten die mit Elipsen gekennzeichneten Varianten zur Diskriminierung zwischen diesen 4 Haplotypen dienen. Hinter den Haplotypen wird in Anteilen von eins jeweils die gefundene Häufigkeit angegeben. Abkürzungen: I = Insertion, D = Deletion. Für die Positionsangaben derjenigen Polymorphismen, die nicht in der NCBI-Datenbank gelistet sind, wurden die Bezeichnungen aus der Publikation von Trembley et al. [52] übernommen.

4 Diskussion

In unserer Arbeitsgruppe wurde in der Vergangenheit die HTR3A- und HTR3B-Untereinheit auf genetische Varianten in Korrelation mit der Häufigkeit von Übelkeit und Erbrechen unter zytostatischer Therapie untersucht [51, 52]. Varianten im HTR3A-Gen zeigten keine Korrelation mit Übelkeit und Erbrechen [51], jedoch im HTR3B-Gen konnte ein signifikanter Zusammenhang einer Drei-Basenpaar-Deletionsvariante an der Position -100/-102 gefunden werden [52]. Diese Variante wurde auch von Frank et al. mit dem Auftreten von manisch-depressiven psychiatrischen Krankheiten in Zusammenhang gebracht [54].

Diese Arbeit konzentriert sich auf den Nachweis einer funktionellen Bedeutung des -100/-102 AAG Deletionspolymorphismus im HTR3B-Gen. Um diese zu analysieren, musste zunächst die Expression des HTR3B-Gens untersucht und anschließend die funktionelle Genstruktur (Transkriptionsstartpunkte) des HTR3B-Gens geklärt werden, wodurch ein alternativer gewebsspezifischer Transkriptionsstartbereich detektiert wurde. Der alternative Transkriptionsstartbereich war nur im Gehirn nachweisbar. Für die sich daraus ergebenden zwei Promotorbereiche konnte jeweils eine eigene Promotoraktivität gezeigt werden.

Die Analyse der Deletionsvariante im Luciferase-Reportergen-Versuch zeigte keine funktionelle Bedeutung und auch durch Tandem-Klonierung wurde kein Effekt des Polymorphismus nachgewiesen. In Gelshift-Versuchen wurde eine Varianten-abhängige Proteinbindung an die Region des Polymorphismus detektiert. Diese Unterschiede der Bindung in Abhängigkeit vom Polymorphismus waren allerdings nur relativ schwach. Übrig bleibt als mögliche Erklärung für die in medizinischen Studien gefundene Bedeutung der -100/-102 Deletionsvariante eine genetische Kopplung. Die in dieser Arbeit durchgeführten Kopplungsanalysen haben eine ausgeprägte Kopplung für den Bereich des HTR3B-Gens gezeigt.

4.1 Expression der HTR3A- und HTR3B-Untereinheit in menschlichen Geweben

Gewebeexpressionsmessungen von HTR3A und HTR3B in den für das Erbrechen relevanten Geweben, nämlich Gehirn, Dünndarm und Dickdarm, zeigten, dass beide Untereinheiten sowohl im Gehirn als auch im Darm exprimiert werden. Eine besonders hohe HTR3B-Expression viel im Gehirn auf. Auch im Dünndarm waren signifikante HTR3B-

Transkriptmengen detektierbar. HTR3A war hingegen nur in Dick- und Dünndarm in höheren Mengen exprimiert [Abbildung 9].

Nachdem im Gehirn das größte Vorkommen von HTR3B in den untersuchten Geweben gefunden wurde, werden nun einzelne Bereiche des Gehirns diskutiert. Die Betrachtung einzelner Bereiche des Gehirns bestätigten die Expression der HTR3A- und HTR3B-Untereinheiten im Gehirn. Interessanterweise traten die Untereinheiten ausschließlich ko-exprimiert auf oder wurden gar nicht exprimiert [Abbildung 9]. Zudem wurde auch zwischen den einzelnen Untereinheiten eine extreme Variabilität der Genexpression beobachtet. Die höchste HTR3B-Expression wurde in den Mandelkernen, die höchste HTR3A-Expression hingegen im *Nucleus caudatus* detektiert. Dieses Ergebnis ist ein Hinweis auf eine heteromere Zusammensetzung des 5-HT₃-Rezeptors im Gehirn.

Da der 5-HT₃-Rezeptor als Liganden-gesteuerter Ionenkanal aus 5 Untereinheiten zusammengesetzt ist, schließt sich daran die Frage nach der genauen Komposition des Rezeptors aus den fünf Untereinheiten an. Einschränkend zu bemerken ist, dass meine Ergebnisse sich nur auf die mRNA-Transkriptmengen beziehen, die nicht unbedingt die Mengen an exprimiertem Protein widerspiegeln müssen [84]. Jedoch sind große Unterschiede in der mRNA-Expression ein Hinweis auf variable Proteinexpression, die die Zusammensetzung und Funktion des pentameren Rezeptors bestimmen könnte.

Bei der Betrachtung der Genexpressionsergebnisse im Gehirn, Dün- und Dickdarm, wie sie in Abbildung 9 dargestellt sind, fällt die hohe Variabilität der Verhältnisse der Untereinheiten A und B untereinander ins Auge. So zeigte sich, dass die Untereinheit-B im Gehirn mit 1:20 deutlich stärker exprimiert ist als die A-Untereinheit. Im Dünndarm ist das Verhältnis A zu B wie 1:1, im Dickdarm ist die A-Untereinheit sogar stärker exprimiert als die B-Untereinheit. Es wurden auch extreme Unterschiede in der Expression der Untereinheiten in einzelnen Bereichen des Gehirns festgestellt [Abbildung 9]. In den Mandelkernen zum Beispiel fand sich ein extrem hoher Anteil an HTR3B gegenüber der A-Untereinheit. Im *Nucleus caudatus* dagegen überwiegt die A-Untereinheit und im *Hippocampus* sind die Einheiten A und B in gleichem Maße exprimiert. *Hypothalamus*, *Pons* und die *Medulla oblongata* zeigen kaum bis keine Expression der HTR3A- und B-Untereinheiten. Für die *Medulla oblongata* wurde dies schon in der Arbeit von Dubin et al. gezeigt [32]. Trotzdem überrascht dieses Ergebnis, da die *Medulla oblongata* der Bereich ist, in dem der *Nervus vagus* endet, die *Area Postrema* und der *Nucleus tractus solitarii* sowie die Serotonin-produzierenden Raphe Kerne lokalisiert sind, welche an der Entstehung von Erbrechen nach zytostatischer Therapie beteiligt sind

[85]. Zudem wurden 5-HT₃-Rezeptoren durch Inkubation mit einem selektiven 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten bereits im Bereich des *Nucleus tractus solitarius* sowie der *Area postrema* nachgewiesen [43]. Auch in der Ratte, der Maus, dem Frettchen und der Katze ist das Vorkommen von 5-HT₃-Rezeptoren im Bereich des Hirnstammes eindeutig belegt [86]. Eine mögliche Erklärung dafür, dass HTR3A und HTR3B in den Genexpressionsuntersuchungen nicht gefunden wurden ist, dass die in dieser Arbeit verwendete mRNA aus Abschnitten der *Medulla oblongata* bestand, die zufällig nicht die Bereiche in dem die Rezeptoren exprimiert werden, enthielten. Diese Theorie wird dadurch unterstützt, dass bekannt ist, dass sie 5-HT₃-Rezeptoren in hoher Dichte nur in begrenzten Bereichen der *Medulla oblongata* detektiert wurden [43]. Zu bedenken ist zudem, dass das Signal der vagalen Afferenzen nicht nur zu Ausschüttung von 5-HT, sondern auch zur Ausschüttung von Substanz P und Acetylcholin führt, die dann in Folge zentral gesteuertes Erbrechen auslösen, so dass das Erbrechen zentral nicht ausschließlich von Serotonin abhängig ist [9] (siehe hierzu Abbildung 2).

Bislang sind 5 verschiedene Untereinheiten, A, B, C, D und E, des 5-HT₃-Rezeptors bekannt. Davon werden nach den Ergebnissen der Arbeitsgruppe Niesler et al. [39] ausschließlich die Untereinheiten A und B im Gehirn exprimiert. Die 5-HT_{3A}-Untereinheit kann ohne die anderen Untereinheiten einen funktionstüchtigen Rezeptor bilden, während die 5-HT_{3B}-Untereinheit alleine unfähig ist, sich vom endoplasmatischen Retikulum zu lösen und einen funktionalen Rezeptor zu formen [42]. In Anwesenheit der A-Untereinheit jedoch kommt es zur heteromeren Zusammensetzung des Rezeptors aus A- und B-Untereinheiten [35]. Spannungsmessungen an diesen heteromer zusammengesetzten Rezeptoren entsprachen eher den physiologisch beobachteten Eigenschaften des 5-HT₃-Rezeptors als dem homomer aus A-Untereinheiten zusammengesetzten Rezeptor [35]. Zudem hat Barrera et al. gefunden, dass nach Überexpression der A- und B-Untereinheit, sich die Untereinheiten in der Reihenfolge BBABA im Uhrzeigersinn anordnen [31]. Die in meiner Arbeit detektierten schwankenden Verhältnisse der Genexpression der Untereinheiten HTR3A und HTR3B in verschiedenen Regionen des Gehirns, die zum Teil erheblich vom 2:3 Verhältnis abweichen, lassen vermuten, dass auch die Rezeptorzusammensetzung aus A- und B-Untereinheiten variabel ist. Die von Barrera et al. gefundene BBABA-Konfiguration muss keinesfalls allgemein gültig sein, sondern ergab sich möglicherweise dadurch, dass die Wissenschaftler die beiden Untereinheiten im Verhältnis 1:1 exprimiert haben. Soweit aus der Publikation ersichtlich, wurde nicht systematisch verfolgt, ob sich die Konfiguration bei unterschiedlichen Expressionsverhältnissen ändert. Die Gültigkeit der BBABA-Konfiguration mag ferner

dadurch eingeschränkt sein, dass nach unseren Ergebnissen die B-Untereinheit im Gehirn nicht in der von Barrera et al. verwendeten Proteinelänge exprimiert wird.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Genexpression der Untereinheiten A und B gewebespezifisch variabel sind, ebenso wie das Verhältnis der Untereinheiten untereinander. Alle Ergebnisse in den HTR3B- und HTR3A-exprimierenden Geweben weisen auf eine mögliche variable gewebespezifische Rezeptorzusammensetzung hin, was dann wiederum zu physiologischen Unterschieden in den Rezeptoreigenschaften führen könnte.

In weiteren Diskussionen ist Folgendes zu bedenken: Die Hirnregionen sind teilweise nicht so klar voneinander zu trennen und es wäre dringend wünschenswert, die Verteilung der 5-HT_{3A} und 5-HT_{3B}-Rezeptoruntereinheiten mittels in-situ-PCR (RNA-Verteilung) oder mittels Immunhistochemie (Proteinverteilung) darzustellen, da dabei auch innerhalb der definierten Hirnteile erhebliche Unterschiede herauskommen könnten. Wenn wir zum Beispiel in Abbildung 9 in der *Medulla oblongata* fast keine HTR3A- und HTR3B-Expression gefunden haben, schließt das nicht aus, dass in 1/100 der Zellen regional differenziert doch eine Expression stattfindet.

4.2 Alternativer Transkriptionsstart des HTR3B-Gens im Gehirn

Aus den erheblichen gewebespezifischen Unterschieden der Genexpression der Untereinheiten A und B, wie sie in Abschnitt 4.1 beschrieben wurden, stellt sich die Frage: Wie kann es zu so starken Transkriptionsschwankungen kommen? Bei der Betrachtung der Informationen zu der Struktur des HTR3B-Gens in der Literatur fiel auf, dass sie sich nur auf einmalige Klonierungen beziehen [32, 35] und es bisher keine systematischen Untersuchungen zum Transkriptionsstart gibt. Zur Klärung des Transkriptionsstartpunktes wurden 5'-RACE Untersuchungen durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen nur für den Dünndarm einen eindeutigen Transkriptionsstart an der Position -1 bezogen auf das ATG-1, wie es von den anderen Autoren als einziger Transkriptionsstartpunkt angenommen wurde ([32, 35], NCBI-Datenbank). Alle Transkripte, die im Dünndarm kloniert und sequenziert wurden, begannen genau an dieser Position [Abbildung 14]. Die Transkripte im Gehirn und Dickdarm begannen nicht an einer definierten Base des Genoms, sondern an unterschiedlichen Nukleotiden konzentriert auf zwei Regionen von ca. 460 Basenpaaren. Ein derartiger nicht eindeutig definierter Beginn von Transkriptionsstartpunkten widerspricht zunächst dem einfachen molekularbiologischen Modell, ist aber inzwischen gut bekannt. Kimura et al. [87] beschrieben Bereiche von ca. 500

bp, in denen Transkriptionsstartpunkte kumulieren. Bei der Arbeit von Kimura et al. handelt es sich um eine umfassende Untersuchung, die in großem Maßstab eine Vielzahl von Transkriptionsstartpunkten in verschiedenen Geweben bestimmt hat. Ebenso wie in meiner Arbeit wurde die RLM-RACE Methode verwendet. Es zeigte sich dabei, dass über 50% aller Gene mehrere Promotoren verwenden. Im Durchschnitt wurden für jedes untersuchte Gen 80 Transkriptionsstartpunkte gefunden, die zu durchschnittlich 3,1 Promotorbereichen pro Gen führten, wenn die Transkriptionsstartpunkte in Bereiche von 500 Basenpaaren zusammengefasst wurden. In Anlehnung an die Arbeit von Kimura et al., wurden die Bereiche des HTR3B-Gens jeweils zu einer putativen Transkriptionsstartregion (Promotorbereich-1 (P1) und Promotorbereich-2 (P2)) zusammengefasst [Abbildung 13]. Im Promotor-1-Bereich liegen die bereits beschriebenen Transkriptionsstartpunkte, die in cDNA-Bibliotheken von peripheren Organen detektiert wurden (Dünndarm, Dubin et al. 1999 [32] und fetales Nierengewebe, Davies et al. 1999 [35]). Dies stimmt überein mit den beschriebenen Ergebnissen meiner 5'-RACE-Untersuchungen. Auch hier lagen die Transkriptionsstartpunkte nur in peripheren Transkripten (Dünn- und Dickdarm) im Bereich P1. Alle Transkripte des Gehirns begannen im Promotorbereich P2 [Exon 1b Abbildung 13]. Das bedeutet, dass das Exon 1 in allen Gehirntranskripten fehlt, dafür für die lange Gehirnisoform [5-HT_{3B}-Gehirn-1 Abbildung 17B] jedoch einige Aminosäuren hinzukommen. Dies scheint nichts Ungewöhnliches zu sein, denn wie in der Literatur beschrieben, beginnen 50% aller alternativen Transkripte im Menschen mit einer abweichenden Sequenz, stimmen jedoch in der Folgesequenz überein [88]. Die Tatsache, dass im Gewebe des Dünndarms der Transkriptionsstartpunkt nicht wie im Gehirn und im Dickdarm auf einen Bereich gestreut ist, sondern auf eine definierte Base fällt, könnte ein Hinweis auf eine in diesem Gewebe spezifische Transkriptionsinitiation und eine starke Promotoraktivität sein. Die Existenz und Quantifizierung der verschiedenen Transkripte wurde mittels qRT-PCR zusätzlich verifiziert [3.2.4].

Aus den RACE Ergebnissen ergeben sich vier mögliche ATG-Startkodons [Abbildung 17A]. Nur die Transkripte aus Dünn- und Dickdarm, die das ATG-1 und ATG-2 beinhalten, führen zu dem vollständigen bisher bekannten Protein. Die Transkripte im Gehirn enthalten das ATG-1 und das ATG-2 nicht. Aus der Verwendung des ATG-3 leitet sich das Protein 5-HT_{3B}-Gehirn-1 ab, aus ATG-4 das Protein 5-HT_{3B}-Gehirn-2 [Abbildung 17B]. Das vollständige 5-HT_{3B}-Protein beginnt mit einem Signalpeptid und enthält noch vor der ersten transmembranären Domäne eine β -Faltblattstruktur (β 1- β 2) sowie die für die Rezeptorfamilie charakteristische Cystein-Schleife [Abbildung 17B]. Sequenzbetrachtung zeigt, dass sich das

Gehirn-1-Protein von dem vollständigen 5-HT_{3B}-Protein nur leicht in der Signalproteinsequenz unterscheidet. Nach der Abspaltung dieses Signalpeptids durch Peptidasen sollte das Protein mit dem Protein des vollständigen Proteins identisch sein.

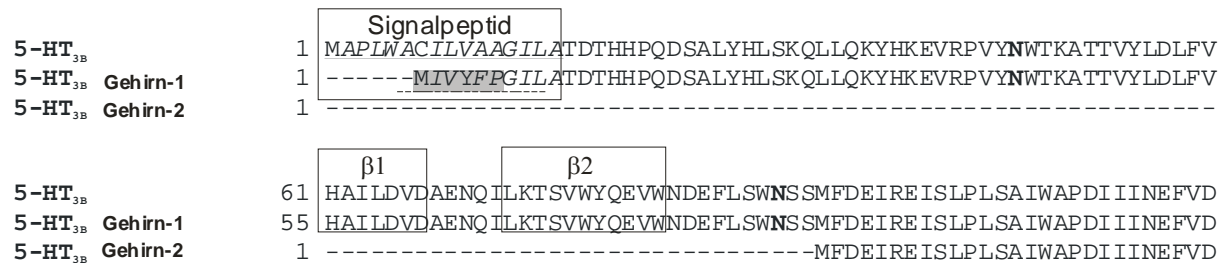


Abbildung 39: Aufbau der N-terminalen Proteinsequenzen der 5-HT_{3B}-Isoformen. Potentielle Glykosylierungsstellen sind fett gedruckt (N).

Soweit die in Abschnitt 3.2.1 beschriebene kurze mRNA tatsächlich im Gehirn exprimiert wird, würde dem entstehenden 5-HT_{3B}-Gehirn-2 Protein nicht nur das Signalpeptid für die Zellmembranlokalisierung fehlen, sondern auch der für die Familie der Cys-Loop-Liganden-gesteuerten Ionenkanäle charakteristische β 1- β 2-Bereich. Für die 5-HT_{3B}-Untereinheit lässt sich in Analogie zu Untersuchungen am Acetylcholin-Rezeptor vermuten, dass der β 1- β 2-Bereich für die Ligandenbindung und Porenöffnung wichtig ist [81]. Der β 1- β 2-Bereich soll mit dem extrazellulären Teil zwischen der transmembranären Domäne 2 und 3 nach Ligandenbindung interagieren und so eine Konformationsänderung bewirken, die letztlich zur Öffnung der Ionenpore führt. Das wird bestätigt durch eine Untersuchung, die zeigte, dass Punktmutationen im β 1- β 2-Bereich des 5-HT_{3B}-Rezeptors zu einer Reduktion der Ligandenwirkung am Rezeptor geführt haben [34]. Sollte also das Gehirn-2-Protein trotz fehlenden Signalpeptids tatsächlich in 5-HT₃-Rezeptoren integriert werden, so würde die Ligandenbindung vermutlich reduziert und die Rezeptoren mit diesen Proteinen würden sich erheblich von Rezeptoren aus vollständigen Proteinen unterscheiden. Eventuell würden in der Sequenz für das Gehirn-2-Protein auch mögliche Glykosylierungsstellen an der Aminosäure Asparagin wegfallen, die für die korrekte Faltung des Proteins und die Freigabe des Proteins aus dem Golgi-Apparat essentiell sein könnten [29] [Abbildung 39]. Alle in der Literatur beschriebenen elektrophysiologischen Untersuchungen an 5-HT₃-Rezeptoren aus A- und B-Untereinheiten wurden an der hierfür überexprimierten vollständigen B-Untereinheit durchgeführt (Proteintyp 5-HT_{3B} in Abbildung 39). Sollten die Gehirn-2-Isoform tatsächlich gebildet und in die pentameren Rezeptoren integriert werden, so wären weitere Messungen der Spannungsabhängigkeit solcher Rezeptoren aufschlussreich.

4.3 Promotorbereich P1 und P2

Als Promotor-1 (P1) wurde der Bereich von -2137 bis +28, als Promotor-2 (P2) wurde der Bereich von +2464 bis +4539 Basenpaaren hinter dem ATG-1 bezeichnet [Abbildung 40]. Beide Promotorbereiche zeigten im Luziferasevektor pXP2 eine Promotoraktivität.

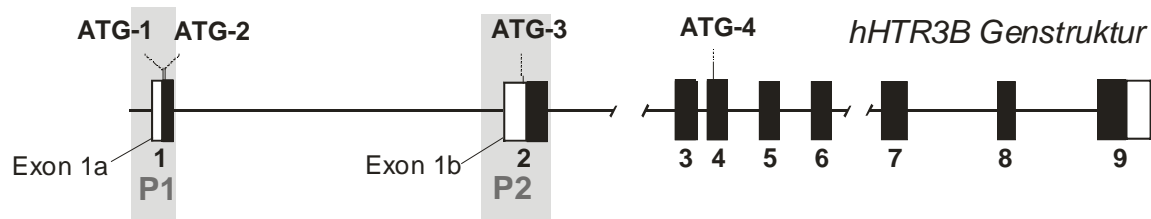


Abbildung 40: Dargestellt ist die HTR3B-Genstruktur, um die Lokalisation der möglichen ATG-Startkodons, der Exons und der Bereiche Promotor 1 (P1) und Promotor 2 (P2) zu verdeutlichen.

Für P1 konnte in den Zelllinien HEK293 und Colo320 eine Promotoraktivität gesehen werden. Diese Zellen exprimieren konstitutiv keine 5-HT₃-Rezeptoren [Abbildung 10]. In Zelllinien, die HTR3B exprimieren (PC-12, CaCo-2 und Lan-1), zeigte P1 keine Promotoraktivität. P2 zeigte auch in HEK293-Zellen eine Promotoraktivität, aber auch in der Ratten-Phäochromozytom-Zelllinie PC-12 und der menschlichen Neuroblastom-Zelllinie Lan-1, beides Zelllinien, die Htr3b/HTR3B konstitutiv exprimieren.

Entscheidend für die Beurteilung der Ergebnisse ist die Wahl der Zelllinie. Im Zusammenhang mit der Untersuchung einer Genvariante, die in dieser Weise nur beim Menschen auftritt, war es wünschenswert, eine menschliche Zelllinie zu nehmen, die HTR3B exprimiert. Für die Untersuchungen speziell zum Promotor-1 sollten nach Möglichkeit in dieser Zelllinie konstitutiv exprimierte HTR3B mRNAs ihren Transkriptionsstart im Exon 1a haben bzw. für P2 im Exon 1b. Die Suche nach einer Zelllinie, die konstitutiv den Promotor-1-Bereich verwendet und sich zudem noch mit pXP2 transfizieren lies, war erfolglos. Alternativ wurde die HEK293-Zelllinie verwendet, die Promotoraktivität für P1 aufwies, jedoch nicht das Gen exprimiert, aber vormals von vielen Autoren für Überexpressionsversuche für HTR3B beschrieben wurde [35] [41, 42].

Für den Promotor P2 erfüllte die Lan-1-Zelllinie alle gewünschten Bedingungen und ist somit eine gute Modellzelllinie. Ebenso eignen sich PC-12-Zellen, die zwar aus der Ratte sind und somit einen anderen Promotor haben, jedoch den vagalen Nervenzellen vor allem nach Differenzierung sehr ähnlich sind und Htr3b exprimieren. Aufgrund ihrer Fähigkeit sich zu

Nervenzellen zu differenzieren [Abbildung 11] wurden sie als Modellzelllinie für die EMSA-Versuche eingesetzt.

Bei dem HTR3B-Promotor 1 sowie dem Promotor 2, der im Gehirn gefunden wurde, handelt es sich um Promotoren ohne TATA-Box. Dies ist nach Kimura et al. der „Normalfall“ [87]. Dort wurde gefunden, dass 89% aller Gene, die zwei oder mehr alternative Promotoren verwenden, keine TATA-Box aufweisen. Im Promotorbereich 2 fand sich ein Initiator-Element (C/T C/T A N T/A C/T C/T) [78, 89] an einer Stelle mit perfekter Übereinstimmung der Sequenz und an einigen Stellen mit nur einem *Mismatch* als potentielle Transkriptionsinitiation [Abbildung 15]. Initiatorelemente können somit nur eine untergeordnete Rolle in der Transkription des HTR3B-Gens spielen. Das *TFIIB recognition element* (BRE) mit der Konsensus-Sequenz G/C G/C G/A C G C C, an das TFIIB bindet, kommt zwar zweimal im P1 und einmal im P2 vor, direkt an das 3'-C soll jedoch für die Auslösung der Transkription die TATA-Sequenz angeschlossen sein, was in allen drei Fällen nicht so ist [78, 89]. Alles in allem fanden sich, abgesehen von dem Initiatorelement, keine bekannten Transkriptions-Initiationssequenzen in beiden Promotorbereichen, so dass ungeklärt bleibt, auf welche Weise die Transkription initiiert wird.

Bei der Untersuchung der Rattenpromotorsequenz auf potentielle Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen [TRANSFAC Datenbank: Abschnitt 3.6.1] fanden sich interessanterweise die meisten Transkriptionsfaktoren, die für den Menschen in P1 und P2 vorausgesagt wurden, in der allgemein angenommenen Promotorregion der Rattensequenz wieder. Weiterhin sind Sequenzähnlichkeiten in den Promotorbereichen P1 und P2 von verschiedenen Säugern untersucht worden. Abbildung 41 stellt die Homologie der genomischen DNA-Sequenzen der Organismen Maus, Ratte und Hund im Vergleich zum Menschen zusammen. Es zeigten sich Bereiche mit hoher Sequenzhomologie in allen betrachteten Organismen.

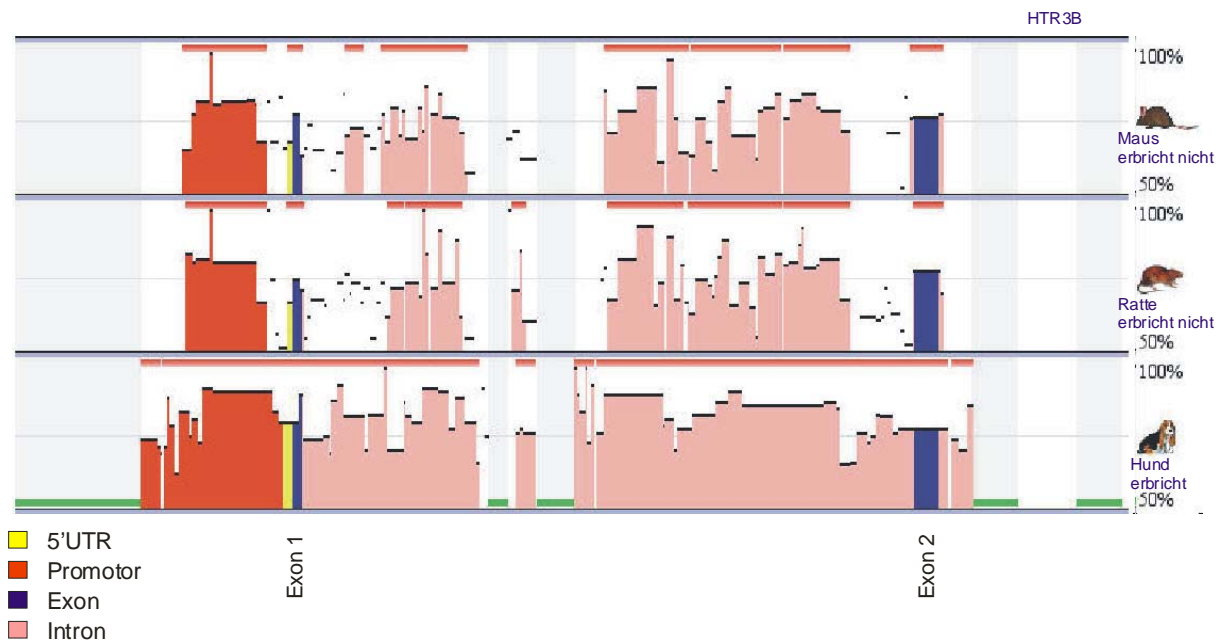


Abbildung 41: Sequenzvergleich zwischen Säugetieren: Verglichen wurde die genomische Region um Exon 1 und Exon 2 zwischen verschiedenen Spezies im Vergleich zum Menschen. Erstellt wurde dieses Alignment mit dem ECR-Browser (www.ecrbrowser.dcode.org). Der Bereich beginnt 2000 Basenpaare vor dem ATG-1 bis 8400 Basenpaare nach ATG-1. Blau dargestellt sind die Exons, rot der Promotor, gelb die 5'UT-Region und rosa die Introns. Die Höhe der Balken signalisiert die Homologie mit der Sequenz des Menschen. Grün sind die Bereiche die weniger als 50 % Homologie zeigen. Bild: ECR-Browser [90]

Es war bereits bekannt, dass die Htr3b-Sequenzen von Ratten und Mäusen untereinander zu 95% übereinstimmen. Verglichen mit der humanen Sequenz findet sich jedoch, wie Hanna et al. berichteten, nur eine Übereinstimmung von 73% [80]. Beim Vergleich unterschiedlicher Spezies bleibt zu bemerken, dass nicht alle Tiere auch unabhängig von genetischen Ähnlichkeiten, und damit Rezeptorbeschaffenheiten und Rezeptordichte, wirklich Erbrechen können. So ist der GI-Trakt von Ratten so konzipiert, dass Erbrechen unmöglich ist. Ein erheblicher Unterschied zwischen der Ratte und dem Menschen bezüglich der 5-HT₃-Rezeptoren ist zudem, dass, so in der Literatur beschrieben, die Ratte ungleich dem Menschen nur die Htr3-Untereinheiten A und B exprimiert, wobei die B-Untereinheit bei der Ratte nicht im Gehirn exprimiert ist [91].

4.4 Einfluss von Glukokortikoiden auf die Genexpression

Im Zellversuch mit PC-12-Zellen der Ratte zeigte sich einzig durch die Zugabe von Dexamethason zum Medium eine Induktion der Htr3b-Expression [Abbildung 24]. Die dafür verwendete Glukokortikoidkonzentration betrug 0,01 – 10 μ M und lag damit im normalen Bereich für die Verwendung in Zellkulturversuchen [92]. Diese entspricht auch Plasmakonzentrationen wie sie beim Menschen unter einer hochdosierten Therapie mit

Dexamethason (z.B. 100 mg Dexamethason / Tag) vorkommen können. Da sich die Htr3b-Expression durch Änderung der Konzentration des Dexamethasons von 0,01 μM auf 10 μM nicht mehr weiter steigern ließ, ist anzunehmen, dass das Plateau der Induktionsmöglichkeit durch Dexamethason schon mit der 0,01 μM Konzentration erreicht wurde. Interessant wäre es daher, den Versuch noch einmal mit Konzentrationen im Bereich $<0,01 \mu\text{M}$ zu wiederholen, um die minimale Dexamethasonkonzentration herauszufinden, bei der schon die maximale Htr3b-Expression erreicht wird. Zu bemerken ist, dass es sich bei PC-12-Zellen um eine Zelllinie aus der Ratte handelt. Ob die hier gezeigten Ergebnisse auch auf den Menschen übertragbar sind, bleibt fraglich. Ein Versuch mit menschlichen Lan-1-Zellen zeigte keinen Einfluss von Dexamethason auf die HTR3B-Expression [Abbildung 25].

Der Einfluss von Glukokortikoiden ist im Zusammenhang mit der Forschung an Zytostatika-induziertem Erbrechen besonders interessant, da Glukokortikoide bekanntermaßen in der Therapie der schweren Übelkeit und des Erbrechens bei Zytostatikatherapie zusammen mit 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten vorteilhaft sind ([22], www.oncosupport.de). Aufgrund der Induktionsversuche an Rattenzellen sowie den bioinformatischen Untersuchungen der Promotorbereiche in dieser Arbeit könnte ein modulierender Einfluss der Glukokortikoide auch auf die Expression der menschliche Serotonin-Rezeptoruntereinheit B vermutet werden, der dann wiederum durch eine Änderung in der Rezeptorzusammensetzung die Funktion des Rezeptors beeinflussen könnte.

Es stellt sich die Frage nach dem Mechanismus, mit dem Dexamethason möglicherweise auch die HTR3B-Expression im Menschen beeinflussen könnte. Glukokortikoide wirken nach Diffusion in den Zellkern entweder über direkte Bindung des Glukokortikoid-Glukokortikoidrezeptor-Komplexes an das Glukokortikoid responsive Element (GRE) mit der Sequenz G G/A A C A N N N T G T C/T C, wobei N beliebige Basen sind, oder die Glukokortikoide wirken über eine Interaktion mit Transkriptionsfaktoren wie AP1 und NFkappaB [93].⁴

Die nicht restriktive TRANSFAC-Datenbankrecherche nach Glukokortikoid-Bindungsstellen [3.6.1] im Promotor-1-Bereich zeigte eine potentielle Glukokortikoid-Bindungsstelle im Bereich der Variante. Die dortige Sequenz stimmt jedoch nicht mit der oben beschriebenen Konsensussequenz überein. Da sich die Konsensussequenz jedoch aus zwei spiegelbildlichen G G/A A C A Bindestellen für die als homodimer bindenden Glukokortikoidrezeptoren

⁴ Die „schnelle“ Wirkung von Glukokortikoiden über G-Protein-gekoppelte Signalwege 94. Maier, C., et al., *G-protein-coupled glucocorticoid receptors on the pituitary cell membrane*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 15): p. 3353-61, 95. Di, S., et al., *Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism*. J Neurosci, 2003. **23**(12): p. 4850-7. wurde nicht berücksichtigt.

zusammensetzt, kann die Bindung einer einzelnen Rezeptoreinheit nicht ausgeschlossen werden. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass diese Bindung eine funktionelle Bedeutung hat. Auch im P2 Bereich zeigte sich eine Bindungsstelle für Glukokortikoide, die jedoch auch nicht genau mit der Konsensussequenz übereinstimmt.

Dexamethason könnte auch über die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren einen Einfluss auf die Transkription ausüben. Welche Transkriptionsfaktoren das sein könnten wurde durch eine, auf nervensystemspezifische Transkriptionsfaktoren beschränkte, Datenbankrecherche in der TRANSFAC-Datenbank ermittelt. Als potentiell bindende Transkriptionsfaktoren für P1 wurden NFkappaB und PBX detektiert und für P2 Hand1E47, CoupTF, der Estradiolrezeptor und sehr häufig PAX6 [3.6.1]. Für CoupTF und Hand1E47 konnten in der zugänglichen Literatur keine Angaben zu Interaktionen mit Glukokortikoiden gefunden werden. Da nicht einmal Ethinylestradiol im Induktionsversuch eine Auswirkung auf die Htr3b-Expression gehabt hat, ist es unwahrscheinlich, dass Glukokortikoide über diese Bindungsstelle eine Wirkung auf die HTR3B-Expression ausüben. Zu allen weiteren Transkriptionsfaktoren wird in der Literatur ein Zusammenhang mit der Wirkung von Glukokortikoiden beschrieben [96-99]. Interessanterweise befand sich der Bereich, in dem NFkappaB binden könnte, im Bereich -523 bis -259 bp. Dieser Bereich hatte auch in dem Experiment, in dem das P1 Fragment im Luziferasevektor verkürzt wurde, eine Bedeutung für die Transkription gezeigt [3.3.2]. Der Transkriptionsfaktor NFKappaB liegt also in einem für die Transkription besonders wichtigen Abschnitt der DNA. Dies sind viele Hinweise darauf, dass Glukokortikoide auch in menschlichen Zellen einen Einfluss auf die HTR3B-Expression haben könnten. Zukünftige Untersuchungen könnten hier Antwort geben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Dexamethason in der Konzentration 0,01 – 10 μ M eine 3-fache Steigerung der Htr3b-Genexpression in Rattenzellen bewirkt. Die Frage nach der Übertragbarkeit dieses Ergebnisses auf Zellen des Menschen und die Frage nach dem Mechanismus über welchen dieses ausgelöst wird, führte bislang nur zu vielen nicht untersuchten Hypothesen.

4.5 Bedeutung der -100/-102 Deletionsvariante

Die -100/-102 Deletionsvariante im HTR3B-Gen wurde auf ihren funktionellen Einfluss untersucht, um die klinische Korrelation mit Zytostatika-induzierter Übelkeit und Erbrechen [52] sowie mit der zentral ausgelösten manisch-depressiven Erkrankung [54] zu erklären.

In der Literatur bestehen offenkundig Differenzen über die funktionelle Genstruktur des HTR3B-Gens. So gingen Frank et al. vermutlich aufgrund der mRNA-Sequenz AF169255 davon aus, dass es sich bei der -100/-102 Deletionsvariante des HTR3B-Gens um eine 5'UTR Variante handelte und stellten die Hypothese auf, dass die Variante möglicherweise zu einer Veränderung der mRNA-Faltung führt, wodurch die Translation beeinflusst würde [54]. Durch die in Abschnitt 4.2 durchgeführte Transkriptionsstartanalyse ist jedoch für die Position der -100/-102 Deletionsvariante eindeutig belegt, dass es sich um eine Promotorvariante handelt. Mit Ausnahme von wenigen Transkripten im Dickdarm wurde der Bereich, in dem die Deletionsvariante liegt, nicht transkribiert. Für Transkripte im Gehirn liegt die Variante sogar ca. 4000 Basen vor dem Transkriptionsstartbereich. Die Transkripte des Dickdarms spielen in der Genese der manisch-depressiven Erkrankung sowie des Zytostatika-induziertem Erbrechens wahrscheinlich keine Rolle.

In der Literatur wurde für viele Promotorvarianten gezeigt, dass sie erheblich die Transkription beeinflussen und dadurch funktionelle und klinische Bedeutung haben können [100-103]. Als Beispiel sei hier das humane Matrix-Metalloproteinase-2 Gen genannt, bei dem Price et al. 2001 fanden, dass die -1306 C>T Promotorvariante eine funktionelle und medizinische Bedeutung hat [100, 104].

2005 wurde von Mottagui-Tabar et al. eine Arbeit über die geeignete Vorgehensweise bei der Identifikation von funktionell bedeutenden erblichen Varianten in 5'-flankierenden Bereichen von menschlichen Genen publiziert [103]. Die Autoren haben ebenfalls Luziferase-Reporter-gen-Versuche mit ca. 2 kb-Segmenten aus den 5'-Region der Gene durchgeführt. Die Promotorfragmente wurden in Reporter-gen-Vektoren ohne eigene Promotoraktivität kloniert. Diese Konstrukte wurden in je vier Zelllinien transient transfiziert. Interessanterweise wurde festgestellt, dass die Ergebnisse in den verschiedenen Zelllinien stark differierten. Die Luziferase-Reporter-gen-Methode ist auch in anderen Publikationen eine gängige Methode zur Untersuchung des Einflusses künstlich eingeführter oder natürlicherweise in der Bevölkerung auftretender Varianten auf die Genexpression [100, 103, 105-107]. In der Arbeit von Price et al. am humanen Matrix-Metalloproteinase-2 Gen wurde in einem 2 kb Promotorfragment im Luziferase-Reporter-gen-Versuch eine niedrigere Promotoraktivität für das C-Allel der Variante -1306 C>T detektiert. Anschließend wurde mittels bioinformatischer TRANSFAC-Analyse, SP1 als potentieller Bindungspartner auffindig gemacht [100].

Analog zu den gerade beschriebenen Beispielen wurde auch in meiner Arbeit ein 2 kb Fragment des HTR3B-Promotors mit und ohne die Deletionsvariante (rs3831455) in einen

Luziferase-Reportergen-Vektor ohne eigene Promotoraktivität kloniert und in HEK293-Zellen transient transfiziert. Wie in Abbildung 27 dargestellt, zeigte sich keine funktionelle Bedeutung der Deletionsvariante auf die Promotoraktivität. Nach den Erfahrungen von Mottagui-Tabar et al. könnte dieses Ergebnis in weiteren Zelllinien anders ausfallen. Anstelle einer Wiederholung dieser transienten Transfektion in weiteren Zelllinien wurde in dieser Arbeit eine 3-fach-Tandemklonierung des Bereiches um die Variante mit und ohne Deletion in einen Reportergenvektor durchgeführt. Dies geschah angesichts der nur schwachen eigenen Promotoraktivität verstärkt durch einen starken viralen Promotor. Diese Konstrukte wurden dann tatsächlich in drei unterschiedliche Zelllinien (PC-12, HEK293 und CaCo-2) transient transfiziert. Auch dieser Versuch zeigte keinen funktionellen Effekt der Deletionsvariante [Abbildung 29]. Die Tandemklonierung und die Verwendung eines starken viralen Promotors ist ein häufig beschriebenes Vorgehen [100] und geschah aus der Überlegung heraus, dass ein eindeutiger Transkriptionsstart notwendig ist, um den Einfluss von der Deletionsvariante versus Wildtyp zu verstärken. Die dreifache Wiederholung der Sequenz AACTGGCAAACGGAG-(AAG)-GAGGAGAACAGAGTG sollte den Einfluss der Variante verstärken. Es zeigte sich jedoch nur eine schwach über der Aktivität des SV40-haltigen pGL3Promotor-Leervektors liegende Promotoraktivität und kein Unterschied zwischen Wildtyp und Variante. Dies könnte daran gelegen haben, dass die Promotoraktivität des SV40-Promotors im Verhältnis zum Effekt des HTR3B-Fragments zu stark war. Die Verwendung eines Vektors mit einem schwächeren viralen Promotor wie beispielsweise dem TK-Promotor könnte sich in zukünftigen Experimenten als sinnvoll erweisen. Als Schwellenwert ab dem ein Luziferase-Reportergen-Versuch einen Einfluss zeigt, geben Price et al. die Verdopplung der Luziferasemenge an. In meinen Luziferaseversuchen wurde in keinem Fall auch nur annähernd eine Steigerung der Luziferaseexpression um den Faktor 2 detektiert. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Wildtyp versus der -100/-102 Deletionsvariante des HTR3B-Gens keinen Unterschied in Luziferase-Reportergen-Versuche zeigte.

Gelshiftversuche sind ein weiteres unverzichtbares Element und neben Reportergenanalysen eine unabhängige Methode, zur Detektion von Varianten-Einflüssen, in diesem Falle von Einflüssen auf die Proteinbindung [108] [109, 110]. Es existieren keine eindeutig nachvollziehbaren definierten Kriterien, wie die Ergebnisse von Gelshift-Experimenten zu interpretieren sind. Mottagui-Tabar et al. nannten einen zweifachen Unterschied im Wettbewerbsversuch mit 25-fachem Überschuss an nicht markierter Sonde zwischen Wildtyp

und Variante einen „starken“ Unterschied. Jedoch wurden auch signifikante Unterschiede mit weniger Divergenz detektiert und als signifikant akzeptiert, wenn sie reproduzierbar waren.

Im Gelshiftversuch in dieser Arbeit zeigte zunächst die Deletions-DNA Sonde (der DNA-Doppelstrang mit der Sequenz AACTGGCAAACGGAG---GAGGAGAACAGAGTG) eine eindeutig schwächere Proteinbindung als die Insertions-DNA Sonde (der DNA-Doppelstrang mit der Sequenz AACTGGCAAACGGAGAAAGGAGGAGAACAGAGTG) [Abbildung 30]. Dieses Ergebnis war auch reproduzierbar mit einer Sonde, die um sieben Basenpaare am 3'-Ende verkürzt war und wurde bestätigt durch Kompetitionsuntersuchungen mit kalter DNA-Sonde [Abbildung 31, Abbildung 32]. Orientiert man sich an vielen anderen Arbeiten, könnte man einen solchen Befund bereits als einen deutlichen Beleg für die biologische Bedeutung des Polymorphismus betrachten. Die biologische Bedeutung dieser Beobachtung ist jedoch in Frage gestellt durch das Ergebnis weiterer Kontrollexperimente, in denen ich jeweils 3 beliebige Basenpaare innerhalb des interessierenden Bereiches deletiert habe [Abbildung 33]. Hier zeigte sich eine stärkere Proteinbindung bei am 3'-Ende je um 3 Basenpaare deletierten Sonden, als bei der Insertionssonde selbst. Damit ist nicht in Frage gestellt, dass ein oder mehrere Proteine gebunden werden, es lässt aber Zweifel an der biologischen Bedeutung aufkommen. Es könnte sich vielmehr um recht unspezifische DNA-Proteinbindungen handeln, die in Abhängigkeit von der -100/-102 Deletionsvariante unterschiedlich auftreten.

Unabhängig von diesem Zwischenergebnis wurde parallel versucht, die Identität des Bindungsproteins zu ermitteln. Dazu wurden zunächst potentiell bindende Proteine für den Bereich der Deletionsvariante durch bioinformatische Voruntersuchungen ausgewählt und die entsprechenden Konsensus-Bindungssequenzen im kompetitiven Gelshiftversuch untersucht. Diese Versuche ergaben keinen Hinweis auf die Identität des bindenden Proteins [Abbildung 34, Abbildung 35]. Aus diesem Grund wurde auch auf die kostspieligeren Supershift-Untersuchungen verzichtet.

Alle hier durchgeführten funktionellen Untersuchungen konnten also zusammenfassend keinen Einfluss des untersuchten Deletionspolymorphismus auf die Promotoraktivität zeigen. Es konnte auch kein Bindungsprotein identifiziert werden, dass in Abhängigkeit von der Variante unterschiedlich bindet. Gehen wir zunächst davon aus, dass tatsächlich die medizinischen Befunde zur Deletionsvariante reproduzierbar sein werden, so mag dies ein Hinweis auf die Unzulänglichkeit der verwendeten Modellsysteme sein. So ist als erstes die Wahl der Zelllinie zu nennen. Mit dieser Arbeit wurde für das HTR3B-Gen erstmals die Verwendung von unterschiedlichen Transkriptionsstartpunkten gewebespezifisch gezeigt.

Durch diese Erkenntnis ist anzunehmen, dass auch Zelllinien unterschiedlichen Ursprunges den Promotorbereich 1, in dem sich auch die Deletionsvariante befindet, unterschiedlich stark beanspruchen. Da HEK293-Zellen zwar eine signifikante Aktivität des Promotorbereiches 1 in Luziferaseuntersuchungen zeigten, diese jedoch vergleichsweise schwach waren, würde eine Zelllinie, die das HTR3B-Gen endogen exprimiert und die den P1 Promotor nachgewiesenermaßen beansprucht, vermutlich eine sehr viel stärkere Promotoraktivität zeigen und damit eventuelle Unterschiede zwischen der Variante und dem Wildtyp signifikant hervorheben. 2 kb Promotorabschnitte zeigten sich in der Literatur meist als ausreichend, um die wichtigsten Promotorabschnitte zu beinhalten [100, 103]. Es könnten jedoch durchaus weiter 5'-liegende Regionen für die erfolgreiche Transkription von Bedeutung sein. Für die Zellen und Gewebe, die den Promotor-2 vorwiegend verwenden, ist zudem nicht ausgeschlossen, dass der Promotor-1-Bereich für die Transkriptionsinitiation im Bereich P2 von Bedeutung ist. In diesem Fall könnte die Klonierung von P1 vor P2 in den Reportergen-Vektor eine mögliche funktionelle Bedeutung der varianten Stelle preisgeben.

4.6 Genkopplung als mögliche Erklärung

Eine mögliche Erklärung dafür, dass die Deletionsvariante zwar keine funktionelle Bedeutung hat, jedoch trotzdem signifikant mit manisch-depressiver Erkrankung und Zytostatika-induziertem Erbrechen korreliert werden kann, ist, dass die Deletionsvariante mit einer funktionell relevanten Variante gemeinsam vererbt wird. Man spricht hier von genetischer Kopplung bzw. *linkage*; zwei Varianten sind im so genannten *linkage disequilibrium*, wenn sie häufiger als zufällig erwartet gemeinsam vererbt werden. Die betrachtete Variante findet sich dann nur in bestimmten Kombinationen mit anderen Varianten in so genannten Allelen oder auch Kopplungsblöcken bzw. Haplotypen.

Die Region des HTR3B-Gens inklusive des Bereiches, in dem die Deletionsvariante lokalisiert ist, zeigte in der Haplotyp-Analyse der allgemein zugänglichen so genannten HapMap-Daten für US-amerikanische Kaukasier ein hohes Maß an gemeinsam vererbten Varianten. Das wird auch in einer aktuellen detaillierten genetischen Untersuchung der HTR3A/HTR3B-Region von Yamada et al. 2006 bestätigt [111].

Auf Grund dieser Vorinformationen wurde in dieser Arbeit für die Genotypisierungsdaten aus der Studie von Trembley et al. [52] ebenso eine Analyse mit dem Haploview-Programm durchgeführt, die zeigte, dass es nur ein Allel bzw. einen Haplotyp gab, der die Deletionsvariante beinhaltete. Die Zahl der von Tremblay et al. untersuchten Polymorphismen

war allerdings sehr begrenzt und diese waren nur in einem recht engen Bereich um die Protein-kodierenden Regionen herum lokalisiert. Daher bestand das Interesse festzustellen, mit welchen der Haplotypen der HapMap-Datenbank der Deletionspolymorphismus gekoppelt ist, da die HapMap-Datenbank insgesamt mehr als drei Millionen Polymorphismen enthält und beliebig weite Regionen um das HTR3B-Gen herum untersuchen lässt. Sowohl der Datensatz von Tremblay et al. also auch die HapMap Datenbank enthielten gemeinsam die Varianten rs1176746, rs1176744 und rs2276307 [Abbildung 38]. Unter Verwendung dieser Daten wurden in den HapMap-Daten vier mögliche Haplotypen identifiziert, die den Deletionspolymorphismus tragen könnten.

Die Haplotypen dieser Analyse gilt es in zukünftigen Untersuchungen durch weitere Genotypisierungen der Patientenproben zu bestätigen und anschließend die Suche nach der funktionell bedeutsamen Variante fortzusetzen. Die in dieser Arbeit bereits durchgeführte Genotypisierung des Bereiches des von uns neu identifizierten Promotors 2 für Patienten, die besonders viel bzw. gar nicht erbrachen, zeigte keine Varianten in diesem Bereich [3.3.3].

4.7 Ausblick

Nachdem in dieser Arbeit die Existenz von alternativen Transkripten im Gehirn nachgewiesen wurde, ist in zukünftigen Experimenten zu untersuchen, ob diese auch zu alternativen Protein-isoformen führen. Dazu wären mittels Western Blot Analysen die Proteine im Gehirn nachzuweisen und, soweit möglich, isoformspezifisch mit immunohistochemischen Methoden zu lokalisieren. Sollten diese Isoformen existieren, wäre es interessant deren Funktionalität mit der bisher bekannten Isoform zu vergleichen.

Angesichts der hier von mir nicht nachweisbaren Funktionalität der -100/-102 Deletionsvariante kommen Zweifel an den signifikanten klinischen Korrelationen dieser Variante mit Übelkeit und Erbrechen und bipolaren Störungen auf. Wäre das Material verfügbar, würde man die HTR3B-Genexpression in Personen messen, die genetisch homozygot für das deletierte bzw. insertierte Allel sind. Es wäre ideal, diese Messungen in verschiedenen Gehirnregionen, vor allem aber im Bereich des 4. Ventrikels des Hirnstammes in der Medulla oblongata, wo das Brechzentrum lokalisiert ist, sowie in verschiedenen Abschnitten des Dünndarms durchzuführen. Die Durchführung dieser Analysen ist jedoch aufgrund des benötigten Probenmaterials schwierig realisierbar. Alternativ könnte eine neue Studie an einem weiteren Kollektiv von Krebspatienten mit hoch emetogenen Therapien die Zufälligkeit der Ergebnisse der Studie von Trembley et al. ausschließen.

Zunächst gilt es jedoch, die Patientenproben der Studie von Trembley et al. durch neue Genotypisierungen den berechneten Haplotypen zuzuordnen, um eine möglicherweise gelinkte funktionelle genetische Variante ausfindig zu machen. Zudem würden weitere Luziferase-Reportergen-Versuche Erkenntnisse über die Funktionalität der Deletionsvariante liefern. Denkbar sind Klonierungen der beiden Promotorbereiche hintereinander sowie die Tandemklonierung der polymorphen Region in einen Reportergenvektor mit schwachem viralem Promotor. Für die transiente Transfektion dieser und bereits bestehender Konstrukte könnten weitere potentiell geeignete Zellsysteme getestet werden.

Da Glukokortikoide bekannterweise die Therapie mit 5-HT₃-Rezeptorantagonisten zusätzlich verbessern, ist deren Einfluss auf die Transkription der HTR3-Untereinheiten interessant. Immerhin wurde in meiner Arbeit in PC-12-Zellen der Ratte eine Steigerung der Expression unter Dexamethason detektiert. In zukünftigen Versuchen könnten andere Steroidhormone auf ähnliche Wirkung untersucht werden. Es wäre auch interessant die mittels bioinformatischer Analyse vorhergesagte NFkappaB-Bindungsstelle in Verbindung mit dem Effekt von Glukokortikoiden auf die Expression zu untersuchen.

Durch diese Analysen würden pysiologische und pathopysiologische Erkenntnisse gewonnen, die die Therapie mit 5-HT₃-Rezeptorantagonisten und Glukokortikoiden weiter verbessern und möglicherweise neue Indikationsgebiete erschließen könnten.

5 Zusammenfassung

Übelkeit und Erbrechen sind unangenehme Nebenwirkungen von zytostatischer Therapie und Bestrahlung. Die Einführung von 5-HT₃-Rezeptorantagonisten und die Kombination mit Glukokortikoiden verhindern das Erbrechen bei den meisten Patienten. Dennoch zeigt die antiemetische Therapie bei ca. 30% der Patienten keinen Effekt. Diese Patienten leiden weiterhin an starker Übelkeit und an Erbrechen, was zum Teil genetischen Varianten zuzuschreiben ist. Eine solche Variante ist der -100/-102 Deletionspolymorphismus im Gen der HTR3-Untereinheit-B (rs3831455). Dieser Deletionspolymorphismus wurde signifikant mit erhöhter Übelkeit und akutem Erbrechen während emetogener Chemotherapien korreliert. Zur funktionellen Bedeutung dieses Polymorphismus ist bislang nichts bekannt.

In dieser Arbeit wurde zunächst die Expression des HTR3A- und des HTR3B-Gens in Gehirn, Dickdarm, Dünndarm und Niere mittels quantitativer RT-PCR (qRT-PCR) untersucht. Zudem wurde der Frage nach dem Transkriptionsstartpunkt und Promotorbereich des HTR3B-Gens durch *rapid amplification of mRNA ends* (RACE), qRT-PCR und funktionellen Promotoranalysen nachgegangen. Der Einfluss verschiedener Hormone und Arzneistoffe auf die Expression von Htr3b in einer Phänochromozytom-Zelllinie (PC-12) der Ratte und der Einfluss von Dexamethason auf die HTR3B-Expression in humanen neuronalen LAN-1-Zellen wurden untersucht. Außerdem wurde der funktionelle Einfluss der -100/-102 Deletionsvariante auf die Genexpression von HTR3B mittels Luziferase-Reportergen-Analysen und *electrophoretic-mobility-shift*-Versuchen (EMSA) aufgeklärt, gefolgt von bioinformatischen Haplotyp-Analysen und von Analysen auf potentiell bindende Transkriptionsfaktoren.

Die HTR3B-Expression war im Gehirn und Dünndarm höher als in allen anderen getesteten Geweben. Im Vergleich zur HTR3B-Expression zeigte sich bei der Expression von HTR3A eine geringere Expression im Gehirn, aber eine höhere Expression im Dün- und Dickdarm. Die RACE-Analysen zeigten, dass im Gehirn gewebespezifisch ein anderer Transkriptionsstartpunkt verwendet wird als im Dün- und Dickdarm. Dies wurde durch transkriptspezifische qRT-PCR bestätigt. Luziferase-Reportergen-Konstrukte mit dem Fragment +2464 bis +4539, in dem der Transkriptionsstartbereich des Gehirns liegt, zeigten eine Promotoraktivität in Ratten-PC-12-Zellen und humanen LAN-1- und HEK293-Zellen. Die Expression von Htr3b in PC-12-Zellen der Ratte erhöhte sich um das 3-fache unter Dexamethasonbehandlung. Dieser Effekt war bei humanen LAN-1-Zellen nicht zu sehen. Der Bereich -2137 bis +28, in dem die Deletionsvariante liegt, zeigte nach transienter

Transfektion in HEK293-Zellen eine Promotoraktivität. Die -100/-102 Deletionsvariante selbst zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Reportergen-Expression. Auch ein Reportergenkonstrukt, das die polymorphe Region 3-fach hintereinander kloniert enthielt, zeigte nach transienter Transfektion von HEK293-, CaCo-2- und PC-12-Zellen keinen Effekt der Variante auf die Promotoraktivität. Die EMSA-Versuche weisen auf eine vom Polymorphismus abhängige Proteinbindung hin. Es konnte jedoch keine Sequenzspezifität für die Bindung nachgewiesen werden. Die Analyse der genetischen Region des HTR3B-Gens mittels HapMap-Daten zeigte, dass die Deletion in einer Region mit vielen eng miteinander gekoppelt vererbten Polymorphismen liegt.

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen lassen eine gewebespezifisch variable Rezeptorzusammensetzung vermuten. Die in dieser Arbeit erstmals beschriebenen Transkripte im Gehirn kodieren vermutlich für zwei neue Proteinisoformen der B-Untereinheit des 5-HT₃-Rezeptors. Die Existenz dieser weiteren Isoformen der B-Rezeptoruntereinheit muss noch in weiteren Experimenten bestätigt werden. Die -100/-102 AAG Deletionsvariante des HTR3B-Gens zeigte keinen funktionellen Einfluss auf die Promotoraktivität. Eine mögliche Erklärung des zuvor beschriebenen Zusammenhangs der Deletionsvariante mit dem klinisch beobachteten Phänotyp ist über eine genetische Kopplung der Deletionsvariante mit einer funktionell bedeutsamen Variante. Diese funktionelle Variante gilt es in weiteren Untersuchungen zu ermitteln.

6 Literaturverzeichnis

1. Ballatori, E. and F. Roila, *Impact of Nausea and Vomiting on Quality of Life in Cancer Patients During Chemotherapy*. Health Qual Life Outcomes, 2003. **1**(1): p. 46.
2. Olver, I.N., *Update on anti-emetics for chemotherapy-induced emesis*. Intern Med J, 2005. **35**(8): p. 478-81.
3. Gregory, R.E. and D.S. Ettinger, *5-HT₃ receptor antagonists for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting. A comparison of their pharmacology and clinical efficacy*. Drugs, 1998. **55**(2): p. 173-89.
4. Hawthorn, J., K.J. Ostler, and P.L. Andrews, *The role of the abdominal visceral innervation and 5-hydroxytryptamine M-receptors in vomiting induced by the cytotoxic drugs cyclophosphamide and cis-platin in the ferret*. Q J Exp Physiol, 1988. **73**(1): p. 7-21.
5. Schafermeyer, A., et al., *Isolation and receptor profiling of ileal enterochromaffin cells*. Acta Physiol Scand, 2004. **182**(1): p. 53-62.
6. Schwörer, H., K. Racke, and H. Kilbinger, *Cisplatin increases the release of 5-hydroxytryptamine (5-HT) from the isolated vascularly perfused small intestine of the guinea-pig: involvement of 5-HT₃ receptors*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1991. **344**(2): p. 143-9.
7. Minami, M., et al., *Pharmacological aspects of anticancer drug-induced emesis with emphasis on serotonin release and vagal nerve activity*. Pharmacol Ther, 2003. **99**(2): p. 149-65.
8. Torii, Y., H. Saito, and N. Matsuki, *Induction of emesis in Suncus murinus by pyrogallol, a generator of free radicals*. Br J Pharmacol, 1994. **111**(2): p. 431-4.
9. Endo, T., et al., *Neurochemistry and neuropharmacology of emesis - the role of serotonin*. Toxicology, 2000. **153**(1-3): p. 189-201.
10. Cubeddu, L.X., D.T. O'Connor, and R.J. Parmer, *Plasma chromogranin A: a marker of serotonin release and of emesis associated with cisplatin chemotherapy*. J Clin Oncol, 1995. **13**(3): p. 681-7.
11. Cubeddu, L.X., *Mechanisms by which cancer chemotherapeutic drugs induce emesis*. Semin Oncol, 1992. **19**(6 Suppl 15): p. 2-13.
12. Stahl, S.M., *Brainstorms: symptoms and circuits, part 2: anxiety disorders*. J Clin Psychiatry, 2003. **64**(12): p. 1408-9.
13. Stahl, S.M., *Symptoms and circuits, part 1: major depressive disorder*. J Clin Psychiatry, 2003. **64**(11): p. 1282-3.
14. DeVane, C.L., *Substance P: a new era, a new role*. Pharmacotherapy, 2001. **21**(9): p. 1061-9.
15. Forth W, H.D., Rummel W, Starke K, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Lehrbuch: Spektrum Akademischer Verlag, 1998. **7. Auflage**.
16. Loh, K.Y. and N. Sivalingam, *Understanding hyperemesis gravidarum*. Med J Malaysia, 2005. **60**(3): p. 394-9; quiz 400.
17. Tsavaris, N., et al., *Diphenhydramine for nausea and vomiting related to cancer chemotherapy with cisplatin*. J Pain Symptom Manage, 1991. **6**(8): p. 461-5.
18. Takeda, N., et al., *Neural mechanisms of motion sickness*. J Med Invest, 2001. **48**(1-2): p. 44-59.
19. Mutschler, E., *Arzneimittelwirkungen*. Lehrbuch: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1997. **7. Auflage**.
20. Costall, B. and R.J. Naylor, *5-HT₃ receptors*. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord, 2004. **3**(1): p. 27-37.
21. Olver, I.N., *Aprepitant in antiemetic combinations to prevent chemotherapy-induced nausea and vomiting*. Int J Clin Pract, 2004. **58**(2): p. 201-6.

22. Italian-Group-for-Antiemetic-Research, T., *Dexamethasone, granisetron, or both for the prevention of nausea and vomiting during chemotherapy for cancer. The Italian Group for Antiemetic Research.* N Engl J Med, 1995. **332**(1): p. 1-5.
23. Campbell, F.A., et al., *Are cannabinoids an effective and safe treatment option in the management of pain? A qualitative systematic review.* Bmj, 2001. **323**(7303): p. 13-6.
24. Kaiser, R., et al., *Patient-tailored antiemetic treatment with 5-hydroxytryptamine type 3 receptor antagonists according to cytochrome P-450 2D6 genotypes.* J Clin Oncol, 2002. **20**(12): p. 2805-11.
25. Aapro, M., *5-HT₃-receptor antagonists in the management of nausea and vomiting in cancer and cancer treatment.* Oncology, 2005. **69**(2): p. 97-109.
26. Janicki, P.K., *Cytochrome P450 2D6 metabolism and 5-hydroxytryptamine type 3 receptor antagonists for postoperative nausea and vomiting.* Med Sci Monit, 2005. **11**(10): p. RA322-8.
27. Walther, D.J. and M. Bader, *A unique central tryptophan hydroxylase isoform.* Biochem Pharmacol, 2003. **66**(9): p. 1673-80.
28. Hoyer, D., J.P. Hannon, and G.R. Martin, *Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors.* Pharmacol Biochem Behav, 2002. **71**(4): p. 533-54.
29. Berg, J., J. Tymoczko, and L. Stryer, *Biochemie.* Lehrbuch: Spektrum Verlag Gustav Fischer, 2003.
30. Burger, A. and H. Wachter, *Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch.* Lehrbuch: Walter de Gruyter Verlag, 1993. **7. Auflage.**
31. Barrera, N.P., et al., *Atomic force microscopy reveals the stoichiometry and subunit arrangement of 5-HT₃ receptors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(35): p. 12595-600.
32. Dubin, A.E., et al., *The pharmacological and functional characteristics of the serotonin 5-HT_{3A} receptor are specifically modified by a 5-HT_{3B} receptor subunit.* J Biol Chem, 1999. **274**(43): p. 30799-810.
33. Thompson, A.J., et al., *Unbinding pathways of an agonist and an antagonist from the 5-HT₃ receptor.* Biophys J, 2006. **90**(6): p. 1979-91.
34. Reeves, D.C., et al., *A role for the beta 1-beta 2 loop in the gating of 5-HT₃ receptors.* J Neurosci, 2005. **25**(41): p. 9358-66.
35. Davies, P.A., et al., *The 5-HT_{3B} subunit is a major determinant of serotonin-receptor function.* Nature, 1999. **397**(6717): p. 359-63.
36. Kelley, S.P., et al., *A cytoplasmic region determines single-channel conductance in 5-HT₃ receptors.* Nature, 2003. **424**(6946): p. 321-4.
37. Reeves, D.C., et al., *Prediction of 5-HT₃ receptor agonist-binding residues using homology modeling.* Biophys J, 2003. **84**(4): p. 2338-44.
38. Peters, J.A., et al., *The 5-hydroxytryptamine type 3 (5-HT₃) receptor reveals a novel determinant of single-channel conductance.* Biochem Soc Trans, 2004. **32**(Pt3): p. 547-52.
39. Niesler, B., et al., *Cloning, physical mapping and expression analysis of the human 5-HT₃ serotonin receptor-like genes HTR3C, HTR3D and HTR3E.* Gene, 2003. **310**: p. 101-11.
40. Karnovsky, A.M., et al., *A cluster of novel serotonin receptor 3-like genes on human chromosome 3.* Gene, 2003. **319**: p. 137-48.
41. Hapfelmeier, G., et al., *Co-expression of the 5-HT_{3B} serotonin receptor subunit alters the biophysics of the 5-HT₃ receptor.* Biophys J, 2003. **84**(3): p. 1720-33.
42. Boyd, G.W., et al., *Assembly and cell surface expression of homomeric and heteromeric 5-HT₃ receptors: the role of oligomerization and chaperone proteins.* Mol Cell Neurosci, 2002. **21**(1): p. 38-50.

-
43. Ohuoha, D.C., et al., *The subnuclear distribution of 5-HT₃ receptors in the human nucleus of the solitary tract and other structures of the caudal medulla*. Brain Res, 1994. **637**(1-2): p. 222-6.
 44. Weinshilboum, R. and L. Wang, *Pharmacogenomics: bench to bedside*. Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(9): p. 739-48.
 45. Guttmacher, A.E. and F.S. Collins, *Genomic medicine--a primer*. N Engl J Med, 2002. **347**(19): p. 1512-20.
 46. Brockmoller, J., et al., *Pharmacogenetic diagnostics of cytochrome P450 polymorphisms in clinical drug development and in drug treatment*. Pharmacogenomics, 2000. **1**(2): p. 125-51.
 47. Kirchheiner, J., et al., *Impact of the ultrarapid metabolizer genotype of cytochrome P450 2D6 on metoprolol pharmacokinetics and pharmacodynamics*. Clin Pharmacol Ther, 2004. **76**(4): p. 302-12.
 48. Kirchheiner, J., et al., *Impact of the CYP2D6 ultrarapid metabolizer genotype on mirtazapine pharmacokinetics and adverse events in healthy volunteers*. J Clin Psychopharmacol, 2004. **24**(6): p. 647-52.
 49. Jakobsdottir, J., et al., *Susceptibility genes for age-related maculopathy on chromosome 10q26*. Am J Hum Genet, 2005. **77**(3): p. 389-407.
 50. Lemonde, S., et al., *Impaired repression at a 5-hydroxytryptamine 1A receptor gene polymorphism associated with major depression and suicide*. J Neurosci, 2003. **23**(25): p. 8788-99.
 51. Kaiser, R., et al., *Investigation of the association between 5-HT_{3A} receptor gene polymorphisms and efficiency of antiemetic treatment with 5-HT₃ receptor antagonists*. Pharmacogenetics, 2004. **14**(5): p. 271-8.
 52. Tremblay, P.B., et al., *Variations in the 5-hydroxytryptamine type 3B receptor gene as predictors of the efficacy of antiemetic treatment in cancer patients*. J Clin Oncol, 2003. **21**(11): p. 2147-55.
 53. Altshuler, D., et al., *A haplotype map of the human genome*. Nature, 2005. **437**(7063): p. 1299-320.
 54. Frank, B., et al., *Investigation of the human serotonin receptor gene HTR3B in bipolar affective and schizophrenic patients*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2004. **131**(1): p. 1-5.
 55. Barrett, J.C., et al., *Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps*. Bioinformatics, 2005. **21**(2): p. 263-5.
 56. Bacher, A., et al., *Protease inhibitors suppress the formation of tight junctions in gastrointestinal cell lines*. Exp Cell Res, 1992. **200**(1): p. 97-104.
 57. Hidalgo, I.J., T.J. Raub, and R.T. Borchardt, *Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability*. Gastroenterology, 1989. **96**(3): p. 736-49.
 58. Graham, F.L., et al., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. J Gen Virol, 1977. **36**(1): p. 59-74.
 59. Schulz, G., et al., *Detection of ganglioside GD2 in tumor tissues and sera of neuroblastoma patients*. Cancer Res, 1984. **44**(12 Pt 1): p. 5914-20.
 60. Greene, L.A. and A.S. Tischler, *Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(7): p. 2424-8.
 61. Bullock W, F.J., Short J, *XLI-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection*. Biotechniques, 1987. **5**: p. 376-379.
 62. Nordeen, S.K., *Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers*. Biotechniques, 1988. **6**(5): p. 454-8.
-

63. Sanger, F. and A.R. Coulson, *A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase*. J Mol Biol, 1975. **94**(3): p. 441-8.
64. Suzuki, Y., et al., *Construction and characterization of a full length-enriched and a 5'-end-enriched cDNA library*. Gene, 1997. **200**(1-2): p. 149-56.
65. Madhok, T.C. and B.M. Sharp, *Nerve growth factor enhances [3H]nicotine binding to a nicotinic cholinergic receptor on PC 12 cells*. Endocrinology, 1992. **130**(2): p. 825-30.
66. Hargreaves, A.C., S.C. Lummis, and C.W. Taylor, *Ca²⁺ permeability of cloned and native 5-hydroxytryptamine type 3 receptors*. Mol Pharmacol, 1994. **46**(6): p. 1120-8.
67. Kilpatrick, G.J., et al., *1-(m-chlorophenyl)-biguanide, a potent high affinity 5-HT₃ receptor agonist*. Eur J Pharmacol, 1990. **182**(1): p. 193-7.
68. Bukvic, N., et al., *17-alpha-ethinylestradiol and norgestrel in combination induce micronucleus increases and aneuploidy in human lymphocyte and fibroblast cultures*. Teratog Carcinog Mutagen, 2000. **20**(3): p. 147-59.
69. Wu, G.D., et al., *Oct-1 and CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) bind to overlapping elements within the interleukin-8 promoter. The role of Oct-1 as a transcriptional repressor*. J Biol Chem, 1997. **272**(4): p. 2396-403.
70. Furukawa, K., et al., *Expression of 5-HT₃ receptors in PC12 cells treated with NGF and 8-Br-cAMP*. J Neurophysiol, 1992. **67**(4): p. 812-9.
71. Oetjen, E., et al., *Distinct properties of the cAMP-responsive element of the rat insulin I gene*. J Biol Chem, 1994. **269**(43): p. 27036-44.
72. Andersson, K.B., et al., *Sequence selectivity of c-Myb in vivo. Resolution of a DNA target specificity paradox*. J Biol Chem, 1999. **274**(31): p. 21986-94.
73. Muldoon, T.G., et al., *Microsomal receptor for steroid hormones: functional implications for nuclear activity*. J Steroid Biochem, 1988. **30**(1-6): p. 23-31.
74. Li, S.L., et al., *Multiple PU.1 sites cooperate in the regulation of p40(phox) transcription during granulocytic differentiation of myeloid cells*. Blood, 2002. **99**(12): p. 4578-87.
75. Dignam, J.D., R.M. Lebovitz, and R.G. Roeder, *Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei*. Nucleic Acids Res, 1983. **11**(5): p. 1475-89.
76. Gabriel, S.B., et al., *The structure of haplotype blocks in the human genome*. Science, 2002. **296**(5576): p. 2225-9.
77. Tishkoff, S.A. and B.C. Verrelli, *Role of evolutionary history on haplotype block structure in the human genome: implications for disease mapping*. Curr Opin Genet Dev, 2003. **13**(6): p. 569-75.
78. Kadonaga, J.T., *The DPE, a core promoter element for transcription by RNA polymerase II*. Exp Mol Med, 2002. **34**(4): p. 259-64.
79. Kozak, M., *Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation*. Gene, 2002. **299**(1-2): p. 1-34.
80. Hanna, M.C., et al., *Evidence for expression of heteromeric serotonin 5-HT₃ receptors in rodents*. J Neurochem, 2000. **75**(1): p. 240-7.
81. Miyazawa, A., Y. Fujiyoshi, and N. Unwin, *Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore*. Nature, 2003. **423**(6943): p. 949-55.
82. Stegmaier, P., A.E. Kel, and E. Wingender, *Systematic DNA-binding domain classification of transcription factors*. Genome Inform Ser Workshop Genome Inform, 2004. **15**(2): p. 276-86.
83. O'Prey, J., et al., *Transcriptional up-regulation of the mouse cytosolic glutathione peroxidase gene in erythroid cells is due to a tissue-specific 3' enhancer containing functionally important CACC/GT motifs and binding sites for GATA and Ets transcription factors*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(10): p. 6290-303.

-
84. Bustin, S.A., *Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems*. J Mol Endocrinol, 2002. **29**(1): p. 23-39.
 85. Stahl, S.M., *The ups and downs of novel antiemetic drugs, part 1: substance P, 5-HT, and the neuropharmacology of vomiting*. J Clin Psychiatry, 2003. **64**(5): p. 498-9.
 86. Hesketh, P.J., et al., *Differential involvement of neurotransmitters through the time course of cisplatin-induced emesis as revealed by therapy with specific receptor antagonists*. Eur J Cancer, 2003. **39**(8): p. 1074-80.
 87. Kimura, K., et al., *Diversification of transcriptional modulation: large-scale identification and characterization of putative alternative promoters of human genes*. Genome Res, 2006. **16**(1): p. 55-65.
 88. Nagasaki, H., et al., *Species-specific variation of alternative splicing and transcriptional initiation in six eukaryotes*. Gene, 2005. **364**: p. 53-62.
 89. Alberts, B., A. Johnson, and J. Lewis, *Molecular Biology of the Cell*. Lehrbuch: Garland Science, 2002.
 90. Ovcharenko, I., et al., *ECR Browser: a tool for visualizing and accessing data from comparisons of multiple vertebrate genomes*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Web Server issue): p. W280-6.
 91. van Hooft, J.A. and J.L. Yakel, *5-HT₃ receptors in the CNS: 3B or not 3B?* Trends Pharmacol Sci, 2003. **24**(4): p. 157-60.
 92. Sallmann, S., et al., *Induction of interleukin-6 by depolarization of neurons*. J Neurosci, 2000. **20**(23): p. 8637-42.
 93. Beato, M. and J. Klug, *Steroid hormone receptors: an update*. Hum Reprod Update, 2000. **6**(3): p. 225-36.
 94. Maier, C., et al., *G-protein-coupled glucocorticoid receptors on the pituitary cell membrane*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 15): p. 3353-61.
 95. Di, S., et al., *Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism*. J Neurosci, 2003. **23**(12): p. 4850-7.
 96. Mukaida, N., et al., *Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. Nuclear factor-kappa B is target for glucocorticoid-mediated interleukin 8 gene repression*. J Biol Chem, 1994. **269**(18): p. 13289-95.
 97. Subramaniam, N., W. Cairns, and S. Okret, *Glucocorticoids repress transcription from a negative glucocorticoid response element recognized by two homeodomain-containing proteins, Pbx and Oct-1*. J Biol Chem, 1998. **273**(36): p. 23567-74.
 98. Grinchuk, O., et al., *The Optomedin gene is a downstream target of Pax6*. J Biol Chem, 2005. **280**(42): p. 35228-37.
 99. Gesina, E., et al., *Dissecting the role of glucocorticoids on pancreas development*. Diabetes, 2004. **53**(9): p. 2322-9.
 100. Price, S.J., D.R. Greaves, and H. Watkins, *Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene: role of Sp1 in allele-specific transcriptional regulation*. J Biol Chem, 2001. **276**(10): p. 7549-58.
 101. Schulz, S., et al., *The LDL receptor-related protein (LRP1/A2MR) and coronary atherosclerosis--novel genomic variants and functional consequences*. Hum Mutat, 2002. **20**(5): p. 404.
 102. Cayla, C., et al., *Cloning, characterisation and identification of several polymorphisms in the promoter region of the human alpha2B-adrenergic receptor gene*. Biochem Pharmacol, 2004. **67**(3): p. 469-78.
 103. Mottagui-Tabar, S., et al., *Identification of functional SNPs in the 5-prime flanking sequences of human genes*. BMC Genomics, 2005. **6**(1): p. 18.
 104. Xu, E., et al., *A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 promoter is associated with colorectal cancer*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **324**(3): p. 999-1003.
-

105. Husain, A., et al., *Identification of the major promoter and non-coding exons of the human arylamine N-acetyltransferase 1 gene (NAT1)*. Pharmacogenetics, 2004. **14**(7): p. 397-406.
106. Olds, L.C. and E. Sibley, *Lactase persistence DNA variant enhances lactase promoter activity in vitro: functional role as a cis regulatory element*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(18): p. 2333-40.
107. Greer, L.F., 3rd and A.A. Szalay, *Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review*. Luminescence, 2002. **17**(1): p. 43-74.
108. Sambrook, J. and D. Russel, *Molecular Cloning*. Lehrbuch: Cold Spring Harbour, New York, 2001.
109. Wang, Z., et al., *The effects of dexamethasone on rat brain cortical nuclear factor kappa B (NF-kappaB) in endotoxic shock*. Toxicol Appl Pharmacol, 2006.
110. Cann, J.R., *Theoretical studies on the mobility-shift assay of protein-DNA complexes*. Electrophoresis, 1998. **19**(2): p. 127-41.
111. Yamada, K., et al., *Distinguishable Haplotype Blocks in the HTR3A and HTR3B Region in the Japanese Reveal Evidence of Association of HTR3B with Female Major Depression*. Biol Psychiatry, 2006.

7 Anhang

7.1 Genomische DNA-Sequenz des HTR3B-Gens

>ref|NC_000011.8|NC_000011:113277799-113326493 Homo sapiens chromosome 11, reference assembly, complete sequence Gi51511727 3000bp vor und hinter ORF

Primer für P1 und Primer für P2; **ATG-1**

```
ATTAAACCTTTGCATAAAGGGATGCTTCTGCATTGCTTTCCCATAAAACTGCTACCTACATAGCTATAT
TGCCTGTAGCTTGCCTTTCTCTTGTCTTAATTCATCCCATAAGTAGAAGCTGACAATTCAAAGAACTGAT
AGGAAGAGCTGAGACTTTGAGGGCCAGATCAGTCCTCTATGATCTTCCCTCTTGATGAAGCCCCATTTAT
CTGCCCACCCTCTCTAAAGAGTATTTCTCAGATAAACTTTCCATAACTGTGTACCAAAGTTCCCTCCACCA
AGTTACATTTAAATTACTCTTTCTTCTGAAATATTTTCAAATGTATAGCAGAATTGGATGGATAGTACAA
AGAATTTCCCTTAGACCCCCACAATCATTTGAGAATAAGTTAGCGACATGATCAACATGATGTGCCCTGTT
TTTGTTTTTTGTTTTTTTTTTCTTTTCTGAGACAGAGTCTCATTCTGTGCGCCAGGCTGAAGTGCAGTGG
TGTGATCTCGGCTCAGTGCAACCTCTGCCTTCTGGGTTCACAAGATTCTCATGCCTCAGCCTCCTGAGTA
GCTGGAATTACAGGCATGTGCCACCGTGCCGGGCTAATTTTTGTATTTTGTAGTAGAGACAGGGTTTCACC
ATGTTGGCCAGGCTGGCCTTGAACCTCTGATCTCAGGTGATCTACCCACCTAGGTCTCCTAAAGTGCTGG
GATTACAGGCGTGAGCCACTGTGTGCGATCTTCCCTCATTCTTGAATACTTAGTGTGCTGGTCTTACAAA
CAAGGACATTCTTTTGATAATCTCTATAACAATTAATAATCAGGAAACCAACATTACTACATTGCCACATT
ACTACCATCTAATCCACATACCTCATTGAGTTTTCAATTCTTCCCAAATGTTCTTTATAACAAAAGGAT
CCAATTCAGAATCAGATATTGTGCTTGTGTCTCTTTAGTCTGATAGGTTCCCTCAGTCTTTCCCTTAACCTTT
TATAACCTTGGCACTTTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
GGAGTGCAGTGGCACAATCACAGCTCACTGCAGACTCTATCTCCTGAGCTCAAGTGATCCTCCTGCCTCA
GCCTCCCAAGTAGCTGGGACTACAGGAGTGCAACACCATTAATACTAATCTTTTATTTTTTGTGTGGA
GACAGGGTATCCTTATGTAGCTTAGGCTGGTCTCAAATTCCTGGGCTCAAGCAGTCTCTTACTTCAACC
TCCCAAAGTACTGGGATTACAGGTATGAGCCATTGCACCTGGCCACCTTGGCACTTTTGAAGATGCCTG
CTGTTTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
ATTTTTGGCAAGACTATACCGGAAGAGCTATGGAAGCTAGGTGTGCTTGTACTATTGGGGTGTCAATTCT
CCTAGGCTGCTAAGTGGACAGAGCTAGGGAATATATGCATGTATGAACATGTGCAAAACACACATTACATT
TGTATTTATTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTT
TGGAGTGCAGTGGCGCGATCTTGGTTCATGGCAACCTCCACCTCCTGATTCAAACAATTCCCCTGCCTCA
GCCTCCCGAGTAGCTGGGATTACAGGCATGTGCCACCACGCCTGACTAATTTTTGTAGTTTCAGTAGAGA
TGGGGCTCACCATGTTGGTCAGGCTGGTCTCAAACCTCAACCTCAAGTGATCCACTGGCCTCGGCCTCC
CAAAGTGCTGGGATTACAGGCTTGAGCCACCACGCCCAGCTTATTTGCAATTATTTATATATTTAGCAAA
TGTATGAAAACCATGGGTTACACTGATACCTCCAAAACCAAGTCAACACCAAATGGTTATCTTAGTTT
TCTCTCTTTCTGTGTATACCACTCCCTTCAACAACAGTAAGAAAGCAATTAGGCTACATTTATTGTTAG
ATGAAAATTAGGTGTAGAATTCTATGATTCTAAACAAAGGGACTGAGTGATTAGGAGAATAGGAATCAA
ATATATACTTTCCCCCTTCGGTTGGCTCTGTGAAAATTTATATCAAAATTTGCCTCTATAATCTCATTTT
TTAATAAAAAAGCAGGCAGATGTTGGAATGGTATTTGTTTTTCTTTCTAGAGCATCTGGGGGTGTCTA
GAAATGGAATAGTGTTATTGTATAGAATTATGCATCATGTTTCTTAGTAATGAAAAATGAATGCGTAT
TCAATCAAAAAGTGAAAAAAAACCTTTTATTAAATGATGTTGAACTTTGTTTTTCTTCAATAAGCCTA
GAAGCATCTTTCTAGAAGGTTACTTTCTGAATTGTGAGCAGTGAAAAATTTGAGAAGCCCTCCTATTTAT
CAAAAGTCAATGTTTCTTTTAAATTAAGGGCTTAGGAAAAACAAAAGCACTTTTCCATTGCATTGTTT
GCAGTTGTTCTTCATTAGACAATACCAGGTTTCCATTAGCCTTGTGTAATTCAAGAGCCCCAAGAACCACT
GTCAATGCTGAAGATGTTACTGCATAAGTCTGATTTAGAACAGCTATTTGGATTTCATTTATTAATGAA
ATTAGTGTCTGAATGTCAGCAAGAGTACTGCCTTAGGTAAAGGCTGTAAAGGAAATCATATTAGTGTGG
AATTTCTCTCTCTTAGGGGCTCCTCTTAGATTACATTATTCACCTTAGCTATCTCCTGTGAGGAAAAATGGA
AATGTTGGCCACGGTCTGATCTTGGGGCAGAACCAAGGGAGAAGTTAAGGGATTTTCATGACGGCATCAA
TTCCAAAACATTTGCATGGTGTCTGGTATTGCCTTTGGTCCCACTGAGTGTTTACAAAATAGCACCAGTAA
GGATAGCATCAACTGGCAAACGGAGAAGGAGGAGAACAGAGTGGAGAGGAACCTGTTAGGAGAAATGGA
GCGGCATTCCATCTGGTAGGCAAGTTTGCATTTCTCCTTTTGGGATCTGCCCAGGAATGTTGTCAAGTG
TAATGGCTCCCCTGTGGGCTGCATCTGTGCTGAGTGAGTGCCTTTTAAATAATTTTACTAGGCATT
AAGGATTAACCTCTTAGAAGATAGAGACAATTTTGTATACACCGTACTGTAGGACTTCTCAGGCATGTTT
GTTTTTATTTCATCGTCTGTAAATGCCAGTCTGTGTAAGCTATATGGAAAACAATGATTTGTTGTGACT
TGGCTCCTATGATTGCAAATACGTATACATATAGCATCAGACTGTGGGGCTTTTTTACACATAGCTGAAAA
TATGCTCTGAAATGTTATAATTGCTTGATAAATCTCTGCTTCTCTAGAAATCAAGCTCTCTGCAGGTTGA
TTGAGAGTTTGGGGCATTCTTTTCAAATTTGCTTTTATGTGTGGATAATATGTTTTTATTATCCAAAAT
AGTCTTGGCTTCATTATCAGCTGTTAGCAGCCAGAGAAAAAGTCCACTAGATTTGTGATGGCTACAGAT
ATATGTATATCATTTTGGTATTAGAGGCCTTAACATCTCGCCTTACAAAATCTATATAGGTGATGAGTAT
ATCTCTAAAGACAGGTACTATAAACTGGTAAGTTTGTAGTCTACAATTCCTCTTAAAGTAATTTAGAAG
```

TTAATACTTTTTTTCTAAATTTCTAGAACTATATTTCCATGGCACCAGTATTAACCTCTACTGAATTGAA
TCATTTTAGTTAGGATACAATTGATTCTTAGTACATGCGCACAAATCAAGAATTTATGATTATGCTGGTG
TTCTCAACACCCCACTTTCTTGAGGTTTCTCCTAGAGCTCATATCTGAATTTCTCAAGTTTTAGGATGTAA
CTGGAAGTGGAATGAGTCAATTATAGAGATGAGTTAGAAATTTGGTAGCCAGGAAGCTGGAAATGATTTT
TTTATTGGGTAGAGAAGAAAAATAGCCACTTATCATTAAAGTATAAAAAATCCTGGATGTTGAACATAAAG
GATAAAAGCATATCTTAATTGTAAAAAATAAAAAACAGAGGAAGTGTCATTAAATGCCAAATGGGTTTCTT
AGTAGAAAATAATCGTGAACATTAACTAAGATAAAATAGAAAAATGAAGGTAAGAAAAACAGACTAAGTT
CTTAACAATATCTCTCTAATGTTTTGTATTATGCATGATTTTTGTTCTAAATGTAGCAGAAAGAAGTGTT
TTAATAGTGTCTGATAACCCAGTGCTTTACCATAAATCATTCCGTGGATACTTGTTGCAGAAAGACCTGCC
CTGTGGAATTGTACTGGGTTTTACTATGTTTTACTTTACGTATTTTACTATATTTACAAATCAAGATGATT
TGTTAAGTGTAAGAGCACGGAACCAATCCCAGGGGGCAGTGCTGCTGGTATAGAAGGAGCCTGAACAAGG
AGAGCCAGCTAATTCCTGCTTCACCACTCACCAGCCACGTAACCCTGGGAAGTCAATTAATCTCTTAGAG
ACTCAGTTTTCTGTAAAGCTAACTTTATTTTGGATATTCATGACAATCAGATAAGACAGCATTGTTAAAT
TGTAAGGTGAAATGCAAATGTAAGATATTATTAACCTGAAAAACATGCAGAAAAATACCACTGGCTATTT
CTGTCCAATAATATACTCCATACAACATGTCAGTCTTCTTTTTGAAAGGTTACTTGCTGTTGTTCTGAT
ATTCTCAGGGAGCCAGGTTACACTTAATCATGTAGCGTCATGATTAAGAGCTTGGACTTCGAATCCAGAC
CAGCTGTGTGTAATATCACTCCCTTCACCTGCAAGCTTCATGACCTTGGGCAGTGCTAAGCTCACTATG
CCAATAGTCCCTCATCTGCAGGAATAGTGCACCTCAGAGAGCTGTAGAGTACCTGTCTCATAAGTTTG
TTGGGAACTTTGAAGGAGATCATTCTGTGAGGACTTAGCCTGGTGCCTGGCATAACAGTCAGCATTCAAT
TAGTGTTAGGAATTCATAACATAAATCTCATTTTCTTTTAACTCTCAGATATATGTGTAACCTCTCTTAT
AATCCTACAGATACATAGTGAATAAGCAAGAATAGTGCTTTCCATCAAAGTGCCCTGAACACTTTAAGA
TAGGTGCATGGGAGAGTAAGTCATTAAAAACAAGGAAAAACAGGAATAATTTTACTGTGTTCTTATCTTC
CTCCTTTTCAATCTCTCTTCACCTGCAAGTGCTTCATAGCTCAGTCCCTAACACATTCTACTTTCCAGAA
ATCTTACAAGTGAATCATTGGAAGCTGATTATTAGCATTCAAGAAGGCAGTTTTGGCGAGGAATCTTTTC
TGGGTCTGTTGATAGCTTCCATCAGTGTCTGTTGAAACATCACTGAACTGTGAGTCATTTAGTGCTGTG
TGAATGTCACATTAGCTTTCAAGGGGCATAAATTTACTGTTAATTAATGGTCACCTAAATCCTTAATCTCT
CTCCTGTAATTGATCTTTCTCCTCAGGCAAAATTTGCATTATAGTAGAAATGTAATTTATTTCTTCTCC
CATCTTAAACAAAGAAGCTTTTCCCCTTTTGGTTTTATTAAAGCATATTTCCATTTGCTTTATTTTCTCT
CCTTTCAGTGCTTGATTCTCTTTTGTTCCTAGTCTCAGCTTCCAGAACTTTCTCTTTTTTAAACCAAGATTT
TGACCCATTCTAGAAAACATGAGTTTATCCATAGGGAATCTATGGATTGCTTCCTAGACAAGATCGCAGA
GGGAATTTGAGTCTTTGTGAGCAGACAGTGCGAGGAACACATATTCATTTCTCAGAATTATGTTTTAAT
GCTGTCTCGGGTAATTTCTGTATTGAAACATACTCATTTTCGGTGTTTCCCCAACTGAGACTTGAATTGG
GAGCTTCCAAGCGAGGTAAACGTGAAGCTGCCACAGCAAAGTTGGCAGGAAAAGCACTGGGACAGCTTT
GCCTTGTGCTCCTGACTTCCCTCCCCTGGGGTACACCAGCGAGAAATGTTCTCAGGTAGAGAGATTCACA
GCACACTTTTTGACAATAACAGTTCACAAAAACCTACAAATGATGCCTGATGCAAGCCACACACCTTAG
TCCTGCACGCCTGAATAGCTAACGCCATTTTAGGCATCTTCTTGGGTGGATTGTTAGGGAGTTAAAATGC
TCATTAGATTTCCAGTTCCGACGGTAATGAAAGTGATATTGCACTGCCACAAAGGAGTCTGGCATTGTA
CCTCCAGCATTGTTGTTAGCGTTTTTGGTCACTGACATTGTTAAATCATAGAAATTGCTGCCTGTAGCG
GCAAGTGACATGACATCATTCTATAAAGAAATGGGTATAAACAGGATTGTGCGACAGGGAGAAGCGATCTC
ATTTACAGTTTCTGCTGGATCCCTCATACCTTTGGCAGCTCATCAAATAAACCATCAAAACCACTGACA
GCCCAGGCAAATTCACACGCAGGACACTACAGAGAGATTTCACTCACGCACTTTGTGAGGAGGTGTGCAA
TTTGCTTCGGTCCAATGACTGAGTGAAGCATTGAATCCCCTAAGGGCTGGCAAAGCTTGTGAACAAAATA
TCTTTTTGCAATTGAGAAAGCCCTCACAAATTTGTCACTTCCAATTGCTGGTGCTCATTCTCTTGCT
TCCCTTCTCTGGCCTCCCTGGCCTCAACACAGTGCAGCTCCTCTACAAATCAAGATTTTGGGTGAG
AAGAAATGGTTGTTCCCTGGAACCAGAGAGAATTTCTCAAAACAAAGATCTCATTCTGACAAAGTGCA
TTTTATTTAAGGACAGATGAAATGAGAAAAGAGATTTTTTGGAGGAGAAAAGTACAAATTTGGGCTCTCGTTA
ATCCCTTTATCTAGAAATCTATAAAGTTTTTGGGTAAATGGGTTTTCTTCATGTTTTTTTTGCTTGATTT
TTCTATTGAATTTTTGAATTACGCATGAAAAATCAAAAGAAAAACCAACGCGGGAGTTAAGTTTTGGCTA
AGTGTGTAGGTGGGTTTTTTCTAGATGCTAGGAGAGGATGATACAGGAATAAAGAAATTATTCTGTCTCC
AAAATGCAAGATTGTTGTAATAATGGAATTGTAGGTACAGTTTTTCCAACCTTGGAGATGGCGTTGATTTAC
TTGTTTTTACAATGAGTTTTCTCATTGGGCACCTTAGGCCATCAGCTTACTTTAAGCATTGCCAAAGGC
CCCACCAGCTGGCTGTGAATTGATGCAGATTTTGGTGAGCTGAAAGCTATATTCTAGTAAAAGCCACCGA
GTCCTGAACAGTCTGAAACCTCCTAAAGAAACCAAGCTCCTCTTACTTTTATCTTCACAATGATAGTTTA
TTTTCCAGGAATTTAGCCACAGATACACATCATCCCCAGGATTCTGCTCTGTATCATCTCAGCAAGCAG
CTATTACAGAAATATCATAAAGAAGTGAGACCTGTTTACAACCTGGACCAAGGCCACCACAGTCTACCTGG
ACCTGTTTCGTCCATGCTATATTGGATGTGGTAAGGACCATCTTGCCCCCTTCTTATTCTTGTTAACGTCTT
TTGAAACAGTCTGCAGTTCATGCAGGAGCCTATGAGAGGTTATATTCTTGAGATTGTAGTTGAACTGGCA
GGGAAGTTGCGCTAGATTCATTTTAGCAGTTAGGTAAAATATTCAATAGGCAAATCATGCTTTCTAGCCC
CCAGTGACACTGTGAAGGGCAAATTGTCTAGATCATGGAATTAAGATGTTTTAAGAATTGTGAAGCTGG
GTGTGGTGGCTCATGCCTGTAATCCTAGCACATTTGGGAGGCCAAGGTAGGCAGATCACTTGAGCACACGA
GTTGGAGGCCAGCTTAGGCAGCATGGTGAAACCCCTGTGTACCAAAAATAACAAAACCTAGCCAGGCCAT
GGTGATGCATGCTGTAGTTCCAGCTACTCAAGAGGATGAAGAGGGAGAATAGCTTGAGCTTGGGTGGTT
GAGGCTGCAATGAGCCATGATCATGCCACTGCACTCCAGCCTGGGTAGCAGATCCAGACCTTGTCTCCAA

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATTGTGGTCATGGATCACAGTACATATTGTATGAATATTGCTGAAA
CCAAAAACAGTAATAGGTATTTTATCCTATGGTTCACATTTATTATGATAATAACAGATTTAAGAAGAGA
TTCACACTATTATTGCTTGAGATTTAAAGAGAGAAAAAATGCCTTATTATCTTGAGTTTATAAGGGGGC
TTTTATACCTAAAGCGTTTGCTAAGGATGGTGGGGAGAATTTGTTTTATTAAAGCATCCTTTTTCTCCTAT
GTCTGAAAGATGGGCTGTGGGAATGAAACGAACTGTGAAGTAGTTGGCAGAGTCTTAGGAAGCCATC
AACAAGTGATGATCCTGATGGTTAGAACCTCTTCCTCTTCCTCCTTTTTTCTAATTACAAAGTCTTTGAT
TTCAATTGGTCCCAGAGTTATTTTGATTTCTCTCTCTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGACGGAGTCTCTCTCT
GTCACCCAGGCTGGAGTCCAATGGCACGATCTCGGCTCACTGCAACCTTTGCGTCCCCGGTCAAGCAAT
TCTCCTGCCTTAGCCTACCTAGTAGCTGGGATTACAGGCATGCGCCACCACGCCCCGGCTAATTTTTGTAT
TTTTAGTAGAGACGGGGTTTCACCTGTTGGACAGGTTGGTCTCAAACCTCTGACCTCAAGTGATCCATCT
GCCTCGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGAGCCACCACCCGGCAATTTCTCTTAAAAACAG
ACTTTACTGAGCTCGTTTTGTTAAAGTAATTTTAATCATTGTTTTCCCATTACTTCTCAAAAAATTGTTT
TCTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGACAGAGTCTCGCTCTGTGCGCCAGGCTGAAGTGCAGTGGCACAATC
TCTGCTCACTGCAAGCTCCACCTTCTGGGTTTCATGCCATTCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGACTA
CAGGCGCCCCGCCACCATGCCCCGGCTAATTTTTTGTATTTTTAGTAGAGATGGGGTTTCACCGTGTAGCC
AGGATGGTCTCGATCTCCTGACCTCGTGATCCATCTGCCTCAGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCG
TGAGCCACTGCACCCGGCCAAAAATTGTTTTCTAATTGAGGTAAAATATACATATGTGGAAATACACAGA
TATTAAGTGTACAAGCTGATGAATGTTGCTAATTACATATAACCATATAACATTTATTTATTTATTTATT
TTGAGACAGAGTCTGGCTCTGTCAACCCAGGCTGGATTGCAGTGGCACGATCTCAGCTCACTGCAACCTCT
GCCTCCCGGGTTCAAGTGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGATTACAGGCATGCGCCACCA
CATCTGACTAATTTTGTATTTTTAGTAGAGATGGGGTTTCACCATGTTGGTCAGGCTAGTCTCAAACTCC
TGACCTCAAAAGATCTGCCCACCTCAGCCTCCCAAAGTGTTGGGATTATAGGTGTGAGCCACCACACCCG
GCTATTTATTTATTTTTTGGAGATGGAGTCTCACTCTGTTGCCAGGCTGGAGTGCTGTGGCACCATCTTG
GCTCACTGCAACCTCCGCCTCCCGGGGACAAGCAATTTTCTGCCTCAGCCTCCTGAGTAGCTAGGATTA
CAGGTGTCTGCCACCACACTCGGCTTATTTTTATATTTTTTAGTAGAGATGGGGTTCCACCATGTTGGTC
AGGCTGGTGTTGAACCTCCGACCTGAAGTGATTGCGCGCTCAGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAG
GCATGAGCCACGGTGCCCGCCATATAACCCATATCTCTATCAAGATATCAAAGATCCCCGAAAGGTCC
CTTGTTCCCTTCTAGTCCATCCCCATCCTCTTCACCCACAGAGACAAATACTCTCTGATTATTTCTTT
GAGCAGTGATTAGTTTTACTGGTTGTAGAACTCCATGTGATGAAGTTTTATTGTGTGTACTCGATTGTGT
CTGGCTTTTTCACTCGGCATTTTGGAGATTCACTTATGTTGCGGTGTGTATCAGCAGTTTGTTCCTTTTTTC
TTAATAAGTAGTATTCAGTTATGGCTATATCATGATTTGTTTATCCATTCTCCTGTTGACAGGCATTTGG
GTTGTTTCCAATTTTAGGATAGTATGAATAAAGCTGCTAAGAATTTTCTGTACGAGTCTTTTTGTGTAT
ATGTTTCCATTTCTTTTTCTTTTTCTTTTTCTTTTTTTTGGAGACCTTGCTCTGTTACCCAGGCCGGAGT
GCAGTGGCACGATCTCGGCTCACTGCAAGCTCCGCCTCCCGGGTTCACGCCATTCTCCTGCCTCAGCCTC
CGGAACAGCTGGGACTACAGGCGTGTGCCACGACGCCAGCTAATTTTTTGTATTTTTAGTAGAGACAGG
GTTTCACTGTGTTAGCCAGGATGGTCTCGATCTCCTGACCTCGTGATCCACCCGCCCTCGGCCCTCCAAAG
TGCTGGGATTACAGGCGTGAGCCACCGTGCCCGGCGTTTCCATTTCTTTTAAGTAAACCTAGAAGTCT
GTGACTGGGTACAGGAGGGTGTATACTTAATGAGAACTGCCATACTGATTTGCAAAGTGTTGTGCAT
TTTACACTCCCACCAGTAAGCTATGAGAGTTCTTATTGCTACACATCCCTGCCAACATTTGGTGTTACCA
GTCTTTTTAATTTTAGTCATTCTAGTAAGGGTATAATGGTATTTTCATTGAGGTTTTATTAAAAATTTCCCT
AATGGCTAATGATTTTGAACCTCTTTTTCATGTGCTTATTGGCTACTTATAAAATTTTTCTTTGTGAAGTGC
CCATTTAAGCCTTCTCTTATTTTTTAAATTTGGGTCAATTGGTTTTTTTTTTTATTGTTATTATAGATTTATAG
GAGCTATTTATACATCTGGGCACAGTCTTTTTTTAGATATTACCTCCTATATTATATAATATGTATTTA
AATCATTTATTATAATATAACATATAATATAGTAATTACATAATAACATATACATATATAATAAAT
TTTTATTCCCAGTCTGTGCTTTCGCTATTCAATTTCTTAATGGGTCTTACAATGAATAGAAATTTTCAAA
TTTGCTGACATTTGTTAGTTTGTATGGTTTGAATGTGTCCCCAAAATTTCTTTCTTTCTTTCTTTGTTTT
TTTTTGGAGACAAAGTCTCAAAGGCTGGAGTGCAATGGCACGATCTCGGCTCACTGCAGCCGCCGCTCCA
GGGTTCAAGTGATTCTCTTGCTCAGCCTCCCCAGTGACTGGGATTACAGGTGCCTGCCACCATGTCTGG
CTAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTATTTTTAGTAGAGATGGAGTTTACCATGTTG
GCCAGGCTGGTCTCGAACTCCTGACCTCAGGTGATCCGCCTGCCTTGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTAC
GGGTGTGAGCCACCATGCTTGGCCTTTTTTAAAAAAATTTTATTTTTTAGATGAAATCTCTCTCTGTACC
CAGGCTGGAGTGCAATGGCGCAATCTCGGCTCACTGTAACCTCTGCCTCCAGGTTCAAGCCATACTCCA
GCCTCAGTCTCCCGAGTAGCTGGGACTACAGGCACGTGCCATCACACCCGGCTAATTTTTCTATTTTTAG
CAGAGACAGGGTTTTGCCATGTTGGCTAGGCTTGTCTCAAACCTCCTGACCTCAGGTGATCCACCTGCCTC
GGTCTGCCAAAGTGCTGGATTACAGGAGTGAGCCACCACGCCCCGGCCTCCAAAATTTTCATCTGCAAATTC
ATATGTTGATGGTATTTGGAGGTGGGGCCCTTGAAGGTAATTAGGATGGTGGCTATATAAGAAGAGGGGA
GAGAAAGCTGACCTGACATGCTCTTGACCTCTTGCTGTGAGATGCCCTCCTCCATGCTACGATGCAGTGA
GGAAGCCCTGATCGGATGCAGCTCCTTGAGCTTGAACCTTCCAGACCCAGAGCTGTGAAAAATATATTT
TTTTTTTTTTTATAAATTACACAGTCTCAGGTTTTTTCAGATACAGGAACAAAAACGGACTAAGACAAAGT
CCATTTCAATGAACAGTTTTTTTTAATTTTTTAAAAAGATTTAAAAAATGTTTTAAAAATTAATTAATTTG
GCTGGGCGAGTGGCTTACGCCCTGTAATCCAGCACTTCGGGAGGCCGAGGCAGGTGGATCACCTGAGGT
CAGGAGTTTGAGACGACCTCAACGTGGAGAACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAAACAGCCAGGTGT
GGTGGTACATGCCTGTAATCCAGCTACTCAGGAGGCTGAGGCAGGAGAATTGCTTGAACCTGGGAGGCG

CCACCACACCTGGCTAATTTTTGTATTTTTAGTAGAGACGGGGTTTCACCATGTTGACCAGTCTGGTCTT
AAACTCTTGACCTCAAGTGATCTGCCTGTCTTGGCCTCCGAAAGTGTGGAATTACAGGTATGAGCCACA
GTGACCAGCCAATCTATGCATTTTTAGTGGAATGTTTAGCTCATTTGCCAGTACCATCTTGCTATTTGTT
TTCTAGTTTTCTCATCTGTTTTTTGTTCTATTCTCATATCTTACTTTATTTTTCCGGAATTTTTAAATTT
TTAATAAATGTTAAAAATATTTTTAAATATTGGATTATAGTTTCTCTATTAGCTTTTTTAGCGATCCATCTT
TGTATTTTTTTTTAGACTTTGCCTTAGGAATTTCCATATTCATCATTAACTTATTACAGTGACTTAGAAT
TAATATTTTGACACTTCACATAAAATGTACGAACTTACAACAGTAAAATTCATTTACCTGCTCCCGCC
TCTTTTGTGCTACTTTTATCTTCAATTTTACATTTACATACAAAATATAACCCACAAAATGATGTTATTAT
TTTAAGGTAACCTGTTAAAAATAATTTAATGATTCAGTTTCAATTTATTTTAATAGGGATGTTTTTCTATG
TTACTATTTTAGTACTACAGTGAATCAGAGTCTTTGATTTTTTTGGGACTGAGAATTAGGCATTTAAATC
AATGAAAAAATTAATTTGAACTTAAGAGTACAAGGTTTAGGCAGGGCGCTGTGGCTCACGCCGTGAATC
CCAGCACTTTGGGAGGCCGAGGCAGGTGGATCACCTGAGGTGAGGAGTTCGAGACCAGCCTCAACATGGA
GAAACCCCTGTCTCTACTAAAAAATACAAAATTAGCCGGGCATGGTGGCACATGCTCGTAATCCCAGCT
ACTTGGGAGACCGAGGCAGGAGAATTGCTTGAACCTGGGAGGCGGAGGTTGCGGTGAGCCGAGATTGCAC
CATTGCACTCCAGCCTGGGCAACAAGAGCAAACTCCATCTCAAAACAACAACAACAACAACAACA
CAACAACAACAAAAGAGTACAAGGTTTAAATTTTTTTTCTTTTTTACTGATTCAGGTTACTTTGGTGTC
ATTTTCCCCCACTTAGATAAACCCCTAATCAATTGTTTCATTGTAAAGAGGAATATTTAAATGGTACCC
CTAAAATTCCTTTATTATTTTTATTTTTGTTTTTATTTTTTACTTTTTTTGAGATGGAGTTTCACTCTTGT
TGCCAGGCTGGGGTGCAATGGCGTGATCTTGGCTCACCACAACCTCCGCCTCCCGGGTTCAAGCGATTC
TCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGATTACAAGCATGTGCCACCACGCCAGGCTAATTTTGTATTTT
TAGTAGAGACTGGGTTTCATCATGTTGGCCATGCTGGTCTCAGACTCCGGACCTCAGGTGATCTGCCCCG
CTCAGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGAGCCACCGCGCTGGCCCAGAATTCCTCTTTTTAAA
CAACAAATTGTACTTTTCCCAGTTTTTTGTTTGTGTTGTTGTTTTTGGAGATGGAGACTCACTCTGTAC
CCAGGATGTAGTGACGTGGCATGATCTCGGCTCACAGTAACCTCCGCCTCCCGGGTTCAAACGATTCTCC
TGCCTCAGCCTCCTAAGTAGCTAGGATTACAGGCACCTACCACCATGTCCAGCTAACTTGTATTTTTAGT
AGAGAGGGGTTACACTATGTTGGCCAGACTGGTCTCAAACCTCTGACATTGAGTGATCCACCCACCTTG
GCCTCCCCAAGTGTGGGATTACAGGCATGAGCTACTGTGCATGGCCATATTTCCCCAATTATCTTATTA
AGTAAGAGTCCTAGCCCTAAGATCTTAGAAAATATTGTTTAAATTAAATACCAGGAAATACCTCTTACTAA
AAAGCCTAGTCTTAAACAGCTTGAATAGAAAATTCCTTCAAGTTTTTTTATTTTTTATTTTTTTTGGAGACA
GAGTCTCACTCTGTGCGCCAGTCTGGAGTGCACTGGTGCAATCTCGGCTCACTGCAACCTCTGCCTCCTG
GGTTCAAGCGATTTTCTGCCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGATTACAGGTGCCCACCACCACACCTGGC
TAATTTTTGTATTTTTTAGTAGAGATGGGGTTTACCACATTGGCCAGGCTGGTCTTGAACCTCCAGACCGC
AAGTGATCCACCCACCTCAGCCTCCCAGAGTGGTGGGATTACAGGCATAAGCCATCCCGTCCAGCCCATC
TTTTTCTTTCTGACTTCCTATTTATTTTTATTTTTTATTTTTTTTTTTGAGTCAGAGTCTCACTCTGTCA
CCAGGTGGAGTGACGTGGCACGATCTCGGCTCACTGCAACCTCCGCCTCCAGGTTCAAGTGATCTCTCC
TGCCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGATTATAGGCACCCACCACCACGCCTGGCTAATTTTTGTACTTTTA
GTAGAGACGGGGTTTACCATGTTGGCCAGGCTGGTCTTGAACCTCTGACCTTGTGATCTGCCCCGCTCA
GCCTCCCAAAGTGCTAGGATTACAAGTGTGAGCCACTGCACCCGGCCCCCTTCGTATTTATTAAGATAAAG
AAAATTGCTGGCCGGGCGTGGTGGTGGGCACCTGTAGTCCCAGATGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCGCT
TGGACCCAGGAGGCAGAGATTGCAGTGAGCTGAGATCGCTCCACTGCACTCCAACCTTGGCGACAGAATGA
GACTCCGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAATTGCTCAGGCTTTCTTTTAGAGGTTTATTTGGAGATAAATGGA
AAAGGTGTAAAGTATTTATATTAATATTTTCCCTTGAACAAGTGTATCGAATTGAAAATATTTTTCTAA
CTCTTTCTTCTACCTGACAAAAGAAAGTAAATCAGATCTTTATGGTAGGTAAGGAGAACACCATTA
TCTTTTAAAGATGTGGGATTTCCCTACCAGAATTGTAGAATATACTTGTTTGTATTAGACTATGTTAG
ACATGTCCATATATTGAATTTGGCAAATTTCTTACAGAAATCTGAAAAAATTTTATATTCTGTCCCTCT
AGTTTTATCCCTGTCTACCATCTTACATTATCTTCTCCCGTTCTCAGTACAACAATGAGCCTGGACCCA
TGTTTGTCTTCTGCCTGTAAGTCATTCTGCTATTTCCCCTACCAAATGTCTTTCTCTTCATTCTCC
ATCTGCAAAATATTGTAGTCCTTCAAATCTCAGCTCTTAAATAAAATTTTCTCATTTCTCCAAGGTAAG
AGCACTTCCTTTAAATCCACTTAAGTCTGTGTGGATTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTGT
TATTTATTTATTTATTTATTTGAGATAGGGTCTCACTCTATCATCCAGGCTGGAGTACAGTGCGTGACC
TCAGTTCACTGCAACCTCCAGGCTCAGGTGATCTCCACCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGTACTATAG
GTGTATACCACCATATCGGGCTAATTTTTGTATTTTTTGTAGAGACTTAATTTGCCATGTTGCCAGGC
TGGTCTCGAACTCCTGGCCTCAAGTGATCCACTCACCTCAGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCATG
AGCCGCCGGGCTGAGCCAAGTCTGTGTTTTTATTTTATTTATTTTCTGAGCGAGACGCAGTCTC
GCTCTGTGCGCCAGGCTGGAGTGACGTGGCAAGATCTCGGCTCACTACAAGCTCCGCCTCCTCGGTTTAC
GCCATTCTCCTGCCTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGACTACAGGCGCCCCGCACTACGCCCCGGCTAATTTT
TTGTATTTTTTAGTAGAGACGGGGTTTACCATGTTAGCCGGGATGGTCTCAATCTCCTCACCTCGTGATC
CGCCTGCCTTGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTATAGGCGTGAGCTACCGCGCCCCGCAAGTCTGTGTATT
TCTTAATGCACAGTTATTTGTTAAAAATGTTAAATTATGCCCTAATGTAGTGTATGCTACTTGAGGGAAGG
ACTTTCTTACTCATATTCATATTTTCCATAACATGCAGCACTATGTATTTGATTTCCAAGATATTGGATT
GATACTTTGTCATGAATGAATGAATTAATAAATAAAGGTCATTTCTAGGATTATCTTTACAAATGGC
TACTCTAAATGCTCTGTAAATGTCTCTATTGCTAGGTGGGATAAGCCTAAAGTTAGTTCCAGAGG
CAGGGACAGTTCTGAAGGACTTGATAAAAAATCACTCACAGATTCTGCACAGACAAGGACACTCCCAACGT

GAATAGATAA CTTGTTGGATGCATCTGCCAGCATCTGAACTGCTGGCAACTTTTGT TTTAGAAATGAAGAGC
TTTCAGCCCAGCACCTCGCCTCCATTATAATGTTTTGCCTCCTGTTTTGTTTATATAAAAAGACTACAGTC
TTGTCTTAGAATTTCTGGGTATTATGAGTACCTTAGGGAAATCTGATTATAGAGATAATCTACTCAACAG
TGAAGAGTTTTCAATTTGTTTCTATTGAGTTTTGTCAATTCGAATCCCAGATACCTTTGTATTCCAGTCC
ATTGACTAGAGCCTCCCAGCCAGACGTTGAGGCATCTGTTTCTATAGTCTCCGGAACCTGGAAAAAGATAAA
TAAGAATGTAGGGGAATTATCTGTATATTTGCTAACCACCAATTTAGATCTAAATAGACTCCCTCTGTTA
GGAAGACTAATGAATTCGAATCTCTGAAATATCCTTTGCTTTTAACAAGCAAGATGGAAGGTATCTAAA
GAAAAAAAACAGGGCGAGATACACAGAGGGAAAAGCTGTGAATAATGCCACCAGAGAACCAATTATGTTT
ACCAGCTGGCATTGAGAACTTGTTCCTTTGACAAAAAAGATTTTAGTTTTAGCCTCAAAATACTTTT
TGACATTGTGTTCTTCAGGGCTGAATGACGAATCCTCTCAACCACCCCATAAAGTGTAGAAAAAAAT
CTTAACATCATTGTTATATGTAATGTGGCAAGCAATGGGCAAGAAGAGAAAAACAAGCTAAGGCATCAA
TATGGCAGTTAAGAAGAATCAACTGAATAAAATGATAGTGAAATGAAACATGAAAAACAGAGACCTTCCTC
CCAGCCATATGACTGAATCAATGAGGCACATTACGGGGTATGACAGTGATAAAACAACTGGTAAGAAC
TCGAATAGATGTAAAAATGTATTTCTTGTGAAAGCATAGTCAACTACTATATATCTCAGTGATATAAACT
GCATTTTGAACTTTTTTTTCTTTCTATTTGTGGGAACCTCATTGATTGCAACCAAGCCTAGAATGGAACC
TTTTGTGCTTTAGTGGGTGAGACATAATCTATTTTCATGATCTCTCAGTTGGTAAAAATTTGCAAGAAGGC
TGGGCACGGTGGCTCACACCTGTAATCCTAGCACTTTGGGAGGCCAAGGTGGGAGGACTGCTTGAGTCCG
GGAACCTTGAGACCAACCTGGGCAACATAGCACCACCCTGTTTCTACAAAAATTAATAATAATAAATTAAT
TAGCTAGGCACGGTGTTCACATCTCTGGTCCCAGCTACTTGGGAGGCTGAAATGGGAGGATCACTTGGG
CCTGGGAGGTTGAGGCTGCAGTGAGCCATGATTGTGCCACTGCACCCAGCTTGGGCAACAAAGCAAGAC
CTTGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCCAAGAAGTGGTGACACCTAATCTCGAGCTCTCATTAG
AGCTTTTTTTTTCAGCTACCAGGACTCCCGTTGAGCCAGTCTTGTCTGGGAGTCCCTGTGGTCCATCTGC
TCCAAGTTGTTCTTGGGGAAATACTTGTGAATTCAGGTTTTTCACTTTTTTATACTACTTTAAAACTTGC
CTTTCCCAAGTATCTATTTAAATTCATTAATATCTGTAGAACAAGTTCACCTCAGACCAGGCTTTGTTGA
ACCACTAAAGCAGGGCGACTATGTTTCTATGTGCTCCGAATGCCTTCTCTTTCTCAAAGAGAAAAAATAA
TGCTTATTGTTAGTAATTTGCTTTCTTGATTATAAAAAAGGGGAAATTTAAAAAAGTTTCTTGTCTCTT
TCAAATGATGCCACTGGCGCAGAGCCACTGTGTAGTCTCTGTTCTGACACAATTCACGAGCACCATCAA
CATGGACTATAATACCAGTGGTGCCTTCTGACCCCTATCCAACCTGAATTCTCCAGAGTAGTACATAGT
CTTGACCCTGTGCACAAAGAATATGGATTTTTATGTGCTGGATAATTGGACAATTAATTTTCGTATACCC
AGTTCTGGGGAGGAAACGAGAGCTGTTATTTGATTTTCATGCCATCAACTTCCTAAACACTTTTCATTTACT
GAAATTTGGTATTGTACTAAATATTACAGAAATACGAATGTTACCTAAGTGACTCTTGAGCTTTGAACCT
AAATCAGCAAAGGAAATGTTTTACGAATTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAACAGAGGCTCTC
TCTATCACCCAGACTGGAGTGCAGTGGCGCCATCTCTGCTCACTGCAACCTCCGCTCCTGGGTTCAAAC
GATTCTTCTGCCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGATTACAGGCTCCCACCACCATGCCAGCTAATTTTTG
TATTTTTAGTAGAGACGGGGTTTACCATGTTGGCCAGGCTGGTCTTACACATTTTATTTCTATTTCTT
CATCTTGTGTTTTTTATCCTTTTATTCTCTTTTAAGGATGCAGTTTTTAGTGATGGATTATACATGGAAA
GAAATGAAAAAATGAGTTCAAGGAGAGTTCTTTAATAGTATGCATCAGACTTCTTATAAATTTACTGG
AAATGTCTTAAAAACAATTGCCCTTTTCTTTATTAATACATTTTTTTTAAATAGCAGGTTTTTTTTGAGAT
TTAATTCACCCACAAAATTCACCAATTTAAAGTATACAATTCAGTGTTTTTTTAGTATATTCAGTTATGCA
ACCATCACCACTATCTAATTTCAGAACATTTTTATCACCTCAAAAAGAAGCCCTATATCCATTAGCAGTC
ACACCTCACATTCACCCCCAGCAGCCCTAGGCAAACACTCATCTACTTTTTGTTTCTATAGATTTGCCT
GTTCTAGACATATTATATAAGTGGAATCATACCATAAATGGCTTCTTATGACTGATTTCTTTCACTTAGC
ATGCTTTCAAAGTTTCATATATGTTGTACATGCATCAGTATTTTATTACTTTTTATTGCTGTATAATCGA
TTGTATTGATATATACATATTTGTTTATTACTCATCAGTCGATAGATGTTTATATTGTTTCACTTTT
AAGTATCACAATAATGCTGCTATGAATTTTTATACAGGTTTTTTGTGTGGACTTTATTTCTCAGTTT
TCGTGGTTATATACTTCTGAGTAGAATTGTTGCATTATATGATAAATATATGTTTAACTTTTTAAGTAAA
TATCAGACTGCTTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTT
CCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTT
GGAATGCAGTGGCACGATCTTGGCTCATTGCAACCTTCAGCTCCCGGTTCAAGTGATCTCGTGCCTCAG
CCTCGCAAGTAGCTGGGATCACAGGTGTGCGCCGCCACACCACTAATTTTTGTATTTTTAGTAGAGAC
AAGGGTTTACCATGTTGGCCAGCCTGGTCTCAAACCTGCTGACCTCAGGTGATCTGCCTGCCTCAGCCTT
CCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGAGCAACCGAGCCCAGCCAGACTGGTTTTCAAACCTGACTGAATCA
CTTAATAATCCTGCCAGCAATGTTTGAGGGCTCCAACCTCTCTACATCCTTGCCAATATTTGTTATTGTC
TATCTTTTTAATTTTAGCTGTCTTAGTGAGGATACAGTGGTATCTCGTCTGGTTTTGATTTGCAGTTCC
CTGGTGACTAATGATGGTGAGCGTCTTTTCATGTGCTTATTGGCCATTTGTATATCTCCTTAGGAGAAAT
ATATAGCCAAATCCTTTATCCACTTTGTATTATCATTTTTTACTTGTCTAAAAATACACAACATAAAATTT
ATCATCTTGACCTTTTTTAAGCATACAGTTTCAGTGGCATTAAAGTACATTACATTTCTGTGTTACCATCA
CCGTGATTTCAGTCTCCAGAACTCCTTTCATCTTGCAAACTGAAACTCCTTTTTTGTTTTGACCATTCTT
TCCATCTTTTATTACTACTGAGGTTAAACATTTTCATGTGATTACTGGCCATTATATTTCTTTGTGGGA
CAGCTTGGTAACTTAAAAAATACTAATGTTTTTCTGATTATAATATACTTATAGATATGTAGAAAAATA
CAGAAGAATAATACTATAGAGGAAAAAATTCAGTAATTCAAATTATAAAAGCAACCATCGCTGCTAA
TTTTTACTTTTCTCTGCACATGTTTTCTTATAGAATTGATATTCTGGACAAATGTGTTTTAGAGTATATG
TTTTTCTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGACAGAGTCTCGCTTTGTGGCCAGGCTGGAGAGCAGTGGCTCA

ATCTTAGCTCACTACAACCTCTGCCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTACCTCAGCCTCCCGAGTAGCTG
GAATGACAGGCACGTGCCACTAAGCCCGGCTAATTTTTGTATTTTAGTGAGACGGGGTTTCATGGGCC
AGGCTGGTCTTGAACCTCTGACATCAGTTGATCCTCCCACCTCGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAAG
GTGTGAGCCACCGCACCCGGCCCTGTTTTCTCTTTTTGTAAAAATTAATTTAATTTTAAGTTCCAGGAT
ACATGTGCAGGATGTGCAGGTTTGTACATAGGTAAACGTGTGCCATGGTTTGTCTGCACCTATCAACCCA
TCACCTAGGTATTAAGCTCAGCATGCATTAGCTATTTTTCTGACGCTCTCCCTCCCCAAAACCCACCC
TGACAGGCCCCAGTGTGTGTGGTTCCTCTCCGTGTCCATGTGTTCTCATTGTTTCAGCTCCCACCTATG
AGTGAGAACATGTGGTGTGGTTCCTCTCTCCTATGTTAGTTTGTCTGAGGATAATGGCTTCAGCTCCA
TCCATGCCCCGTCAAAGGACATGATCTCATTCTTTTTTTATGGCTGCATGGTATTCACGGTATATATG
TACCACATTTTCTTTTATCCAGTGATCATTGTTGGGCATTTGGGTTGATTCCATGTTTTGCTATTGCGA
ACAGTGAAAACCTGAAACTGTTTACCCATTCAACGATAAATTTCCCTTCCTTCACCCAGCAACTCATTCT
GTTTTCAGTCTCTATGAATTTAGTACTCTAGGTACCTCATTTAAGTGGAATCAGGCAGTATTTGTCCCT
CTGTGACTGGCTTATTTCACTTCCCATCATGTTCTCAAGGTTTCATCCATGTTGTAACATGTGTGAGAATT
TGCTTCCTTCCTTTTTTTTGGAGACGGAGTATCATTCTGTTGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTT
GGCTCACTGCAACCTCCACCCCTGGGATCAAGCAATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCTCGTAGCTGGGATTA
CAGGTGTGCGCTACCACTCCTGGCTAATTTTTGTATTTAAGTAGAGACGGGGTTTCACCATGATGGCTA
AGCTGGTCTCAAACCTCCTGACCTCAAGTGATCCACCCACCTCGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGC
GTGAGCCACCGCGCCAGCTGTAGAATTTCTTCCTTTCTAAGGTTGAATAATATTCTAATTTATGTATA
GTCCACATTTTGCTTATCTATTCTGTGTCGATGGACACTTGGGTTGATTCTACCCCTTGCTATTGTGA
ATAATGCTGCTATGAACATGTGTGTATAAATACCTGTCCAAGCCCTGCTTTCAGTTCTCTTGGGTGTGT
ACTCAGAAGTGGAATTGCTGGATTATATGGTAATTTCTCTTTAACTTTTTAAGAAAAGTGCCATACTGTT
TTCCACAGCAGCTGCACCATTTTACATTTCCACCAACAGTGACACAAGGGTTCCAATTTCTCCCCATCCTC
ACCAACACTTGTTATTTTCTGCTTTTTTAAAAACAGTCGCCATTCTAATGAGTGTGAGTTTGTATCTCAT
TGTGGTTTTGATGATTTGCATTTCCCTAATGATTAGTGATTGTATTAGGAAGTTTGGGCTGCCGTAACAA
ATACCACAGACTAGGTGGCATAAACAACAGAAATTTATTTCTCACAATTCTGGAGGCTGGGAGTCCAACA
TCAGTTCTTGCTGATTTGGTTCTTGGTGAGAGCCCACTTTCTGACTTTCAGATGGTCACCTTTTCACTG
TATACTCACATGGTAGAGAGATCTTTCTCTCTTCTTCTTATAAGGCCACCAATCCTATGAGATTA
GGGTCTATCCCTATGACATCATTTAACCTTAATTACTCCCTATAAGTCTGTCTCCAAATATGAACACC
TTGGAAGTTAGGGTTTCAACATATGGGTTTTGGGGGGACACCGTTTGGCCCATAGCAGTGACCTCGAGCA
TCTTTTAATGTGCTTATTGGTCATTTGTGTATCTACTTTAGAGAGATGTCTATTCAAGTCTCTCACCCAT
TTTTATTTTTATTTTTATTTTTTAGAGACGGAGTCTCACTCTGTCAACCAGGCTGGAGTGCAGTAGCAGG
ATCTGGGCTCACTGCAAGCTCTGCCTCCTGGGTTCACTCCATTCTCCTGCCTCAGCCGCCCGAGTAGCTG
GGACTACAGGCGCCACGACCACGCCCCGCTAATTTTTGTATTTTTTAGTAGAGACGGGGTTTGGCGTG
TTAGCCAGGATGGTCTCCATCTCCTGATCTCGTGATCCACCCACGAGCCTCAGCCTCCCAAAGTCTGGG
ATTACAGGTGCGAGCCACCGCACCCGGCCTCGCCATTTTAAACAGGGCTGCTTGTCTTTTGTGTGCT
TGAGTTGTGGGAGTTCTTTATGTCCTGGATACAAGCCTCTTAATAGATATGTGATTTGCAAAATATTTCT
CCCATCTGTGGGTTGTCTTTTTCACTTCTTGATGGTGTCTTTAAAGCACAAAAGTTTTTAATTTTGGT
GAAGTCTCATTTATTTTTCTTTTGTGTGATGTCTAAGAAACCATTTGCCTAATTCAAAAGTCATGAAGATT
TACTTACTCCTATGGTTTTCTTTAAGAGTTTTATAGTTTAAAGCTCTTACATTTGGGTGTATGATTCATTT
TGAGTTAATGTTTATATACGGTGTGAGATATCCCTTTTTAAAAAATTCCTAAGAACATCTGAGTTTCAGA
ATGTTCTTTACTAGATTAGATATGAAAAAATTTGGTGAGGAGGGTTTTTTTTCTTTTCTTTTTTTTTT
TTTTTTTTTTGAGACAGAGTCTCTCTCTGTCACTAGGCTGGAGTGCAGTGGCACAACATGGCCCACTG
CAATCTTGACCTCCTGGACTCAAGCAATCCTTCCACCTCAGCCTTCCAAGTAGCTGGGACCACTAGGTGT
GTGCCACCACACCTGGCTAATTTTTTAACCTTTTTGTAGAGACAGAATCTCACTGTGTTGCCAGGCTGGT
CTCAAACCTCGGGGCTCAGGCAATCCTCTGTCTTGGCCTCCAAAAATGTGGAATCAGAGGACGAACCA
CTGTGCCAGCCAGGAGGGTTTTTAAATTGCTGTTTTGGGGGCTTTTTAAAAATTTTATGGACTCATT
GCAGACATGGGAAATCACGTCTATTATATCATTTAAAAATATGTTTCATTTATAATAAGCTCATTGAGTCT
GTTTTATAAGCAGAGAAATCCAAACATACGGTAACCTAACAGGAATGGCTGCCAATAACAGTTGAGCTAA
CACTCATTGAAAGATTATGAATAATATCTTGATTACAAATCAAAGCTTGGTCTCATCTTTTTAGCCAAA
ATTACTAAGACAACGTAACATTTTTTAGTCTGATTAATGGTAGAGTAACATAATTAGAGTGGGAAAGAGAT
TAGCAAATCATTCAAGATGTCAAGGGCAGGCAAGTGCCGTTTTGTCTATAGATAATATAGTAAAGCTCAT
AGCGACAGGTGTGCATAATAAGTAAGAACTGAGAATGCCTAGGTATTGAAGAGTCTAGGTAATGTTTTTA
ATATCAGCATTATTTGGTTAGATTTGATTTTCTTCTCTGAATTTCTTACTGCTGAATTTGGCCTTTGAT
TTATTGACATTCTAAGATTTGGAGTGGATTTTCTTTTTGCCTTGCAGGATGCAGAGAATCAAATATTTAA
GACAAGTGTATGGTACCAAGAGGTAAATAATTATGTTTTCTTCTAAATATATTGCACTCCTGATCTGGAT
CTGCTGCAAAATATAGTTATTTAAGAAATAGGTATTATCTTTGTATTTATAGTTTCTTAGATCTGCAGCA
GACCTAATGTATTATAATTCAATTTAAGATGTATGGCCCTGGTTTCTGGTTGGGACTACCATCTTTAGGAT
TCAGATGGGAAGTCCTTCTCCTAACAGGTAGAACCAAGAGGCTGATAAATTGGATTATTAATCCAAATG
CCTCTTTAGTTCTTTAGCGAAGTAGATATTGCCCCATTTTGATAAGTTTCTTTTTGGCTACTACTAACA
GGTCTGGAATGATGAATTTTTATCCTGGAACCTCAGCATGTTTGATGAGATTAGAGAGATCTCCCTACCT
CTAAGTGCCATCTGGGCCCCGATATCATCATCAATGAGTTGTAAGTGTGCCAGTGTGATTTCTGTGGG
GTTTAGACTGCTTGGTATAGTCGGGCCAGTTGCTTACTTTTCAGTCAGTGTGCTCATTTTGTCTCTCT
CAAGTTGAAGGGGAGCATATTGTTGGGAGTATTCAGGTTAGAAGTGCCATGTGTTGACATTATTTAAGAT

ACAGATCTGGTTACTAATGTTGAGGTTACTCATTATGTCTGTGTTGTTATAGCAGCAAATGAGTTAACTT
ACGAGGCTGTCACTGAAAAGCTCATCTTTGCCAGGGTGAATCATCTCATGGAAAATGCGATTCTGTTTTG
CAGGGCTAGGCTGGTCCTGGACCTCATGGTCACTACCATCTCCTAATCAGCCTATGTTTTGAAAATGACCA
ACATCCTCTCTGTGACAACAAGTTCTCTTGTGTTTCATATAGTGTGGACATTGAAAAGATACCCTGACCTT
CCCTATGTTTTATGTGAACCTCATCTGGGACCATTGAGAACTATAAGCCCATCCAGGTGGTCTCTGCGTGCA
GTTTAGAGACATATGCTTTTCCATTTGATGTCCAGAATTGCAGCCTGACCTTCAAGAGCATTCTGCATAC
AGGTAAACCATGAGAGATACCCATTAATGCTAGGTTGGTGCACATAGGTGAAATGATATTATACTATCCT
TCAGGTCTATTTTATTCTTGCAGATAATTGGCTATTTAAAAATTGGAATCTCTTCTTGCGGTTTTTTGGC
TCCTGCTGTAATCCAGACCAAGTATGATGCTGTAGGCCCCCATAGTTGTTTTGGAAACAGTGTTAGGCCT
CTACTGCCATGGATAATATTATAGAAATCGCAGGCAAGCTCCATCATTCTACAGAGAGTGATTTCCAAGC
CATAAATTCACAGTTGTTGTTTTTTTTATGACTAGAAAAGATTTTATTCCACATCCCTACCCCTAATTCAA
ATAAGGCCAAGGAGACTGTGCCTATGGGGGCAGGAGAACGAGGAAGGATTGGAATTGGGAGCTGGAAAAG
TGGGTGGATGTTGGCATCTCTTCTCTCTGGGAAAGTCAATTGTTTGTGTTGTTTGCAGTGGAAGACGTA
GACCTGGCCTTTCTGAGGAGCCAGAAGACATTGAGCATGACAAAAAGGCGTTTTTGAATGACAGTGAGT
GGGAACCTTCTATCTGTGTCTCCACATACAGCATCTGCAGAGCAGCGCTGGAGGATTTGCACAGATTCA
GTTTAATGTAGGTTCTTTACTACCTGTCCCCGTTGCCGCTTCTCCCCAGCCTTTGGCCTTCTCTCTTGG
GCCAAGGAATTTCTGCTCTATTGCATGTTCTCATTATTATACCCAAGAACAGGGACTTCAGCGGGCTC
TGAGCATCCACCTGCATTCCAGCATTTACAGAGCAGAGGTTGAGTGGGAGATGCTGGGCCCTCCAGAA
GATAACAGACACCAGAGGCCTGGTATTGAGACACCAGAGGCCTGAAGCATGCCCTGCAGCAGGAATCCTC
CAATCTTTCCACACACACTTACATTATGGCTTCTAATTGCTACTCAGAAAAAACACAGACAAACCCACAC
ACAACAACAACAATTGGGAAGACTTTCTCATCAACATTATTGTCTCTATTTTTTTTTTTTATTGAGTAAAT
ATCAACTAATTCCAGATGCAGATGCATAATACGATAATATTATTAACCTGAAATATCTTAAGGGATTAGCC
AATAAGACCCACAGAGACCACTGGTAGCTTCTGGATCAGAGGGAACAATTAACCCCTCAAAATTATGAT
GGGAACCCACACTCCTCCGATGCAGCCCTTGGCTGCATTGTTCATAGGGAAATTTGTCCGGCATGAACT
AGGGGATGGTGGGTACAGGACAGTGAAGCCCGCTGATTTGTACTCCAGAGGCAGCCATTGTCCCATCTT
TGGCCCCCTGGGAAACTGTTTTGACACATGGTCTGCAACAATTTACACAACCTGGTAACTACATCATTA
GTATTCAGCAGTGACTTCTTTCTTCTGCAAAAAGTCAGCTAGTGGTGGTGGTAGTGAGGGAATGGTGGT
CCTTCATGCCAAGTAATGGATTGAGTTGAGTTGAAAAATAGAAACCACAGGCAGGTGAGGACTGCACACAAGATG
AATTATCCTAAAAATATACCTTTGGAATAAGAAGGAAAACTTAGACTAGACTAAGGTGCTCTGGTACAAT
GGATATGCTAAGGGGAGGTGAAGAAATAAACTATCATTGCTGAGTGCGGTGGCTCATGCCTGTAATCCC
AGAACTCTGGGAGGCCAAGGCAGGCAGATCATTTGAGGTGAGGAGTTGAGACTAGTCTGGCCAACATGG
CAAAACCCCATCTTTACTAAAAATACAAAACTTGCTGGGTGTAGTGGTGTGTGCATGAGAATCGCTTGA
AGCCGGGAGGTGGAGGTTGCAGTGAGCCAAGATCATAACCTGCGCTCCAGCCTGGGTGACACAGGGAGA
CTCTGTCAAAAGAAAAGAAAGGAAGGAAGGAAGGATGGAAGAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAAAGAA
AGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAA
AGAAACTATTATTGAGGTTACAGGTATCCCTTAATTGGTTAAAGGTGTATACAGCTTTCCAGCAAAGCTC
TTGTTAAATCTGGGCCTCTTAGACACAGTTGTGGTTTGAACCTGACTAATGTATAATGCTGGCTAGTATA
ATCGCAACTCATACCCTCCTGATGGTGGGCTTTGGGCTCTTGCTTAGAATCCTGCTTGGTTTTAAGCAAA
GCTTGCATTGTGGCCTGTTTGTCCACTTTTCTTGTAAAGGAAAAGGGAAGGAAAGCAAGCAAGCTTTTTTT
TTTTTTAAATTTCAATGAGTTTCTTGGCTAGGAGTAAACACCTCATTAATTTTAAAGATATCAGCCACA
AACATTATTAATGCAGCCCGAATAATGGAGAGCATTAAAGGGAAATGTGAAGGAGTAGCACATGCAAGGT
GGAACATAGTCACCTACCAAGTGCTCCTGAGAACCTGCACACACCATTACCTACACTGCACGGAGGAGA
CAAACACAGGAAAGAGATGGGGCAGGTAAACAAGGGCGTGTGCTTGCATACACAGGCACACATGTGCACA
CACACACACACACACTCTCTCTCTCTCCTCAGAGCAGCTATTATTGTTAGTTACATGTCACTTTCTCT
CACCTAAATGTTAATTGCTCAACAGCAGCTGAAGGTTTTCTATATACCATCTCCATTTTAATTATGATG
AACAGAGACAGAAGATTGTCTAATGGAGGGGAGGCTTCCCTGGATCTCAGAGCCATGGTCCAGTTTCTCT
GCTCTCCTCACTGCCATGCTTCCCCCGGGTACGTTTTGAAGTGGAAGTGTGCTGGAGGCAGGTGCAATT
TGATTTTCATGCTCTTGAACCTTTTCCATGGGTCTTTTGGCCCGGGGTGGACGTGGGTATCTAGCAGG
GCTGGCCTCTGCCCTGGTCTCAGGAGCAGAGTAGGGAGAGAATCCTGAGTAGAGTCACAGATCATATTT
GGTGGGACAGGAGGCCAGACTCAGGAGCAATTCTGCAGCTTTAGAAAGACTAAAAGTGGATTGAGTGACG
ATCACAGTTTTCTGCCTCCCAACCTCGCTCAGCCTCCATGCATTTCTGCTCTGTGCACAGAGCCTAGGCT
CATTCTCTTACTCCATACCAGACATCCCACTCTGAATTTAGCAACCAAGGCACCTGGCTTTCTCTCAACA
GCCCTTGGCCAGTGATGTGAAATTCAGAGCCTGATTCTATTATGCCAACACTGGGCCTGCCAGGGTCTCTG
ACAGCAAAGGACCATCTCCTCTTAATCTACTCGCCGGCTGTGTCTCAGTCCAGGCTGCCAGCGGGAGGT
TGGGGACGGGTAGGGAAGTCAGGAGAAGCAATAATCTATTCTAAATTCATCCTTGCCCTTGGCCTGAGGT
ACACTGCTGCCATTTATACTAAATCAAGTGCTCCGGATGCCCCATGAGTTTCAGCTAATGTGCAATCATA
GCTGCCGACTCTGGGACACAAATTGTTTATCAGAGGACACCACGGATACTTTGGAGTCAGGCTACATTCC
ACAGGGGGCCAGAGCATAGGCACTTCTCCCTACAAAGATGTCTGTGTACAGCCTGGGACCCGGCCAGC
AGCCATGGGAGGGGAGGTTTTCTCCAATATATTATTGGAGGTGCTGGTTCCAGAAACAGCAGGGTGAGA
GCATTGTGATTTTGCATGGCAGTGGTTTTTTTTCTTTTTTTCTTTAAAGAATGAGGGTAGAAGTGGGAGGA
GGTAGGAATACAATTTAGGAACCTCGTGTGGATGGAAAAGGGTGGACAGCTGTGGAAACTAAACCGAGCC
CAACCACAGATATCCTCACACCAAGTAAAGTGTTTATTCGGGCAGGAATTGGGGTGGCAGGAGGTGTC
TAGAAAATGCAAAGCGGGCATTGGAAGAAAGGAGGTGCTTCATTATCCTCTTTTTCTGTATATAATTTTT

TTTCTAGATTAGGTAGAGTAACTTTGTTGAGATACTTATTGAATGCAGCTTATAAACTTGATAGAAAATC
AAGATCCCTCTAAGTGCTAGCAGATCATATGAGAGAGAGAGAGAGAAAAGAGAGAGAGAATTTAGAGCCCT
GGATATCCTTTCTGGGTCACTCAAGTGATGTGGGAATCACAGACTGACTTTCTGCTAATCCAGAGCGACC
CATAGTCTAGATCCAAGTAACTCTGACTCCGGTGCTTAAATGGCAGCAACTTTCTGTCTTTCTGAGTT
GGGAATGCTGGGAGGGGCTTTGGAGAGGAGGCAAATGGGTTCTTCTGTATGAAGCGGAGTCTAGGCGTCA
AAATTCCAACGTGTGCATAAAGACGGTCATGCAAACTGAGTACTGGTGGGGTCTACCATCAAGGAGGCA
ATTACAGGCTAACCTTGGGGCCTATTCCATCTCCAAGGAGCTCTCCACACACACATTCCGAATTAGATTG
ATCTCTTTTCATTAACATCAATAGGCTCCAAATACCTTTGTGTACTTATTATTACCTGGCTTTAATGGATA
ATGAAATTGTGGCATAATATTGCTAACACCTGAAGGGTGTCTAATGGGGAACATGGACTGAACTAAAGT
GCTTTTTCTTCCCTTTCTGTGGAATTTAAAGGCACCAGCTCCTTTAGTCCATTAGAAATGATGAGCTGTA
GGTAGGGGCAGTTTTGCGAGAGCAGTGTCTCACTGAGCAGGTGACATGCCTTCTACTCAGCAGAAGCAG
GAGTCACTGCTTCTTGCATGATCTGCAGAGAGGTGCGCCTCAGAAAAGACTGACCTCAAGAGGATAGCCTC
CATTCAGGCTAACTCCACACTTCCATTATATTGGAATAAAAGTAGTGCTACTACCAGACTCCAGTACAA
TTCAATAAACATCTTTTGAGTTCTTACCATGTGCCAGGCTCCATGGTGAACACTTAGGACATAAAGATGA
ATAAATGAAGGCTCCTGACATCTATCACAGATCCCCAAATCTGCCAGGGAGACATAATAGCAATAACC
ACAAAGCTGAGCACTTAGCCTATGCCAAGCACCATTTTTAAAGTTTGTACCTATAATCCTCACATCCCTAG
GAGATGAGTGATCCAAGTATCTGCATTTTACAAATAAATGAATTGAGGTGCAGAGAAGTTAAGTAACTT
ACAGGAGGCTGCAAGGTGACTGGTGGAGCCTGGACTTGAACCCAGGCAACTTGACTCCAGAACTATGTG
CCTAATTCCATATCATGCTGACACACAATAAAGGCAGTGCAGTATATTCTGGTCCATTCTTTGCCATTT
GCCCCACTGGGCATTACTTGGCAGGTGCGGTGTATTAGTGTCAAGGCTGCCATAACAAAGTAGCCCCAAA
CTGGGTGGCTCAAAACAACAGAAATTCATTTTTCTTGCAATTATGTAGGCTGTAAATCTGAAATCAAGACT
TGGGCAGGGTTGGTTCTTCTGGGCATTCTGAGGGAGAATCTGCTCCTTGCTCTCCTCTGCCTCTGGTT
GCTGCCAGGAACCTGTGGTGTCTCTTGGCTGGTAGATGCGTTGCTCCCGTCTCTGCCTCCATCTTCACAT
GGCCTTCTCCTTGTGTGTCTCTTCTCTTCTTATCAGAACTCCAGTCACATTGGATTAAGGGCCCCACTCTA
CTCCAGTATGACCTCATCCTACTCTAGTACATCTTCAATGATATCATTTCCAAATAAGGTCACATTCTGA
GGTTCCAGGAAATGCAATGAATCTTGGGGGCCCTCTTCAACCTAGTAGAGTCTGCAACCCAAAATTCAT
TCTGTCCAGATGCAAAATTCATTAGCCGCATCCCAACATCCCCAAAGTTTAAACCAGCATCATTCAG
TGTCAACTCTTAAAGTCCAAAATATCATCTAAATATAAACTCGAAAAGTCCCAAATCTCATGTGTTAAATG
ATCTAAAGCAGGTAATGACCTTGATTATGGTCCATTCTGGGGCAAATTTCTCTCCTGCAACTGACTCAT
GAAACACTCAATCACCAGAATCTGCTGCCTGATCCTACAAGATGGGATAAGGGCAGGGAACTGTCTTATT
AATAGTACTAACTTCAGTATTTAGGATAGTACCAGACAACCTGTTTCATGCTCAATTAATGTTTATTGAAC
AAAGGAATAAAGGGCTCTGATTATCCAATGAGATAATAAAAAACAAAAATTTCTGAAAATATATGATGA
AATTAGAGTTTATTTAGGCTGCACTGGGTTTGCAGGGAAAATTAGTCTAGGCCTGGCACTGTGGCTAACG
ACTTTGGGAGGCTGAGGCAGGTGGATCACCTGAAGTCAGGAGTTCGAGACCAACCTGGCCAACATGGCAA
AACCCTAAAATGCAAAAATTAGCTGGGCGTGGTGGCAGGTGCCTGTAATCCAGCTACGCAGGAGGCTG
AGGCAGGAGAATCGCTTGAACCTGTGAGGCGGAGGTTGCAGTGAGTCGAGATTGCGTCATTGTACTCCAG
TCTGGGCAATAAGAGCGAAATTGTGTCTAAAAAATAAACTAGTCCATAGGCAACATTGCCCTTAAATA
ACCACAAGAAAAGGTGGATTCTTTCTTCTGGAAGAAAACCAAAACCCAAAATATAGGTACTATTTTGT
GTGTCTTAGAAATGCGAACATCCTTCTAAAGGTAAGAGAATGGATGAGGTGGTTTTGGAAGGCCTATCT
AGTTTTGCGATTCTATAAGCCAAACAAAGACAAGAGACGGCTTTGCTTTATGTTACAGCAGAAGCTAATT
GTCCACCCTTGTCCCTATGTCTTTTCCCTCTGCCTTCATTTACTGTTGACATCCAGTGAGGACTATCCTT
CTGACAGGGTCAGCTAATAATATGCAGGGTTAGTGAAAAATGAAAATGCAGGACCCCTTATTCAAACATT
TTTAAGAATTTCAAAATAGCACCAGTGAGCACTAAACCAAGTGCAGGGCCCTTTCAAGAGCAGGCTCTG
TGTGACTACATAGGTTTCATATCCACAAGCCTGCCTACCTCCTAACCTCTTAGCTCTTGCCACAGCTCTC
CCTCAGATGATTTCTCGGGGAACACGTGGTCTGATAAACTGTACTTTCTTGGAAATCAGGGACCTTGAG
GGGCCACACCATCCATCTCTGGCTCTGTCCAGACATAGATTTGCTGTGCTGTGAGCCTCTGGGTGGAGA
GGTGTCTCTCAGCTTGTTTTCTTTACATAGGGACGTGCTGTAGAGAGCACAGCTGCTCATCTCAGTTGT
ACCCAAGATGTTTGGCAAGGCAAAAGTAACTGCTTTTTGAAAAAGGAGGAAATCAAGGCATGGAGGAGT
TGACTCCATCATCCAGGAGGACTTAACTAGCCCATGCAGACACTTGGAATCAAAGGGCTCTGGAACCTCT
GTCCCTTGGTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTAGACAGAGTCTCACTCTGTTGCCAGGCTGGAGTGCAATGG
TGGGATCTCGGCTCACTGCAACCTCTGCCTCTTGAGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTA
GCTGGGACTACAGGCACATGCCACCACACCTGGCTGATTTTTGTATTTTTAGCAGAGATGGGGTTTGACT
ACTTTGGTCAGGTTGGTCTCAAACCTCTGACCTCAAGTGATCCACCCGCGTTGGCCTCCCAAAGTGCTAG
GATTACAGGCCTGAGCCATCACACCTGGCCTGTCCCCTTGATTTTGAGTCTGGGCTCTTTCTGCTTAACC
AACATGGCTTCTTGTACTTTGCTTATGTTTTCTTCCCCTTTGTATAGTATCTGCCAAGTCTCTAGGGAG
TGTTCCCATTTCTACCCTCCAGAGTCAGCAGGGGTGGTCACCCCGTCACCCCGACCCACAGGGCTAGAT
CACCAATAGCCCAGAATGGGCCACAACATAATACCCCCATGGACTCTGGCCACTTGATTCCCTTTTTCTCT
GCCCCACCTAACACAGCCATCTCAGTCACTGCATGATGACAGGAGCTAGAGGGGTGCAGGCTGATGAC
AGTTAATTTTTGTTGTTGCTTTTCTTGTGACTGCACTTTGGTAGAAATGTGTTTTAACCAGATTATTGCA
AAGCAGTGAGTGTGCTCTGGTTTAGGTATTTGCAGCCAATTATGGTTTAAATGTGAATGACAACAGGCAG
ACAACAATCTCCCAACAACCTCTGGCTTGCCAAGCTCCACAGAGTCGGGATGTGCTCCAGACCCAATGG
CTGGAGAGCCCTACTCTTATCAGCAAGGTGATGTTTCATCTCCCCAGCCAAGCTCTTCTCCCGGCACC
TCCTGCTCCATCACTGGCCTTTGCACTTCATCTCTGCCCTGGCTCATTTCTTTGTGACACTCTTCTCCAG

TGGGAGATGGGGATGAAGGAGAAGAACCCTGCACTCAACTCAGAGGTCTGGTCAGGTCAAGAGTTGTAGC
TATCTTGTCCCGGAAAAAGCACTGGGCTTGGAATCGGAAGATGTGGGGGCACATCCCAGCTCTGTCTCT
TACTCAACTTACTCACTTAAGGGAGCTCAGCTTTTCTTTTGAAAATCTATAAAGTAGAGGCTATTACCTA
CCAAGTTTGCAGCGAGGATTAAATAAATCACACCATATGTGTGAAAAGTGTCCGGCACACTATCTGACACA
TATTGAGCCGTTTATTGTTTGGTGAATCAGAGAAACGGGAGATTTCAAATGTCATTTTTGTCCAAATCCA
ACAGCAAAGGGTCCAGAATACTCATTTGTTTAAATAAACATTTATTGAATACCCACTGTAAGATAGGTCTT
ATTTTTGGCCCCCTTGGGGGATTATCTAACTACCCAGAGATGGGATGAGATGACAGTCCAGGCCGTAGTG
GGGAAGCAGCCCTGCCATTACCTGTTTCTCTTAGGAAGGATGAGAATGGAGTGTGTGCTTATTAAAGA
CACTTGGCCATCATCATTTCAAAGAAGTGAGGTATAAAAAAATGGCAACAATAGTAGTAATTTTATGAGAC
CCAAATTTCCAAGCTACAAGAGCAGCTCTGTGTGGCCAGCACAGTGCAGGCCAGCAGGACAGCTTCAGGCG
GCCTCCACTGAGACGCACTCCTCCACCCCTGCATCTGTGCTCCTGGAGACTGAGCTGTGGCTTGCAAAG
ATGGGACCCTGGTCATGCTTGACCAGTAGGGAGAGGAAGCAGGCAGGGGAAGCAGTGGCAGGAGATGGG
AGGAGGGAGGAGGGCCGAGACGGGGTACTTAGCTCTCCATTTCTGCCCCAGTGGAGTCAACACCAGGCAG
GCTAAGAGAAAACCACAGGTCTATCTGGCAGCCTCTGCACAGCTTTCTCTTCAGGTCTGGTCACCACTC
CAGCCCTTGACTCCTTCAGGCCTAAGGGTGGTAACAGATCACCCAGTCCCCGAAAAGCCAGGGGTCTGC
CCGCCATCTTGTGGTTTCCCTAAAGCCTGCTCACACCTTGAGATAGTCTCATTTTTGAGCCGTCTTCAA
ACTTCCAAATTTAATTGTGCAAGTTTTCTGCCCCGAATGATAGACACACAGGTGCTAAGGAGTTCAGAA
TCCAAGGAAGGAGATAGATTAGACCAAAAAGTAATACAATAAGCCAGGCACGGTGGCTCACACCTGTAAT
CCCAGCACTTTGGGAGGCTGAGGCAGGGGGATCACCTGAGGTCAGGAGTTGGAGACCAGCCTGGCCAACA
TGGTGAAACCCCATCTCTAGCAGAGCTTGACGTGAGCCGAGGTGCGACCACTGCACTCCAGCCTGGGTGA
CAGAGCGAGACTCCGTCTCAAAAAAAGAAACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAAAATAAGCCGGGCAT
GGTGGCACTCACCTGTAGTCCCAGCTACCTGAGAGGGTGAGGCAGGAGAATTGCTTGAGCCTGGGAGGTG
GAGGTTGAGCTGAGATCGCGCCATTGCACTCTAGCCTGGGCAACAAGAGCGAAAACCTCCGTACACACACA
CACAAAAGTAATACAATATATTGCATAATAAGTGGTTTTCAGAAGGAAGATTTTAGTTTTCAAACAGTTTC
TCACTTACCAGCTGGGTGAGTTTAAACAAGGAATTCAACCTCTTTGAAACTCAGTTTCCTGGTTTGTA
ATGAAGTTAATGATACCTGTTTGTAAAATGAAGTTGATACCCAGCCCTTAAAGTTGTGAAGACTGAGTAA
GTTAAGTTTATGAGCCACTGAGTCTGGTGCCTGGCACACAGCAAGTGGTAAGTAAATGCTAGCTGCTGCT
TCTTATTACTACTATTAATAATATTAATATTAGCTCTGTGTAAAACCTAAAGGATTTTTCTCTTTCT
AAACCAAAAAGTAACCTGAAACATATTTCTAAGATAAATTAGACAGATTTTTTACATTATGCAAAAACGT
TGGGTCTTCGGGGAGAATTCCTGGCTATGAATTTGGCCAAATCTGAGTCTGTTGGCCTAGATCCTCTTTT
CATCAGACCCTTGTTCCTCGGCCAGGTGGTGATGCGCAGGCACCCCTGGTCTATGTCGTGAGTCTGCTG
ATTCTAGCATCTTTCTCATGCTGGTGGACCTGGGGAGCTTCTACCTGCCACCAACTGCCGAGCCAGGA
TTGTGTTCAAGACCAGTGTGCTGGTGGGCTACACCGTCTTCAGGGTCAACATGTCCAACCAGGTGCCACG
GAGTGTAGGGAGCACCCCTCTGATTGGTAAGCAGCCTCGGGGTCACTGGACACTCATCTTACATGACCCC
TGTGAAAGATCTAATGCTGGCCAGGCATGGTGGCTCATGCCCGTAATATCAGCACTTTGGGAGGCCAAGG
TGGGAGGACCCTTCAGCTCAGGAGTTCAAGACCAGCCTAGGCAACATAGTGAGACTTTACTAAAAATTT
TAAAAATCAACAGGGCATTCAGTGCATACTCACTACAACCTCTGCCTCCTGGGCTCAAGCAATTCCTCTG
CCTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGATTATAGGCACACACCCTACACCTGGCTAATTTGTTGTATTTTTAG
TAGAGACGGGGTTTTACGATGTTGATCAGGCTGGTCTTGAACCTCCTGACCTCAGGTGGTCCGCCCACCTC
AGCTTCCCAGAGTGCTGGGATTACAGGCATGAGCCCACTGTGCCTGGCCGCTTTGTTTGTTTTTATCCCC
AATTTCAACCAATTACCCAAAGTGACTGAGCCATTGATTTTCAGCTATTTCAGGAAGCTGAGGCAGGAGGAT
TGCTTGAGTCTAAAAGTTTGAGTCTGCAGTGAGCTATGATCCCACTGCACTCCAGCCTGGGTGACAG
AGCAAGAACGGAAGGAAGGGGAGGGGAGGGAAGAGAGAGAAAAAGAAAGAGAGAAAGAGA
GAAAGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGA
AATCACAACATTTTTGGGAGGCTGAGGTGGGAGGATTGCTTGAGCCCAAGAGTTCAAGACAACATGTGAG
GACTTGTCTCTCTCTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTAGATGGAGTCTTGCTGTGTCTCCAGGCTGGAGTGCAG
TGGTGTGATCTCCGCTCCCTGCAACCTCCGCTCCTGGGTTCAAGCAATTCCTCCTCAGCCTCCAGA
GTAGCTGGGACTACAGGCGCCCGCCACCATGCCTGGCTAATTTTTTGTATTTTAGTATAGACGGGGTTTC
ACTATGTTGGCCAGGATGGTCTCGATCTCCTGACCTTGTGATCCACCCGCTCAGCCTCCCAAAGTGTG
GGATTACAGGCGTGAGCCACCAAGTCCGGCCGTGAGGCCTTGTCTCTACCAAAAAATAAAAAAAATTAGC
CTGGTGTGGTGGTGTGTGCTGTAGTCCCAGCTATTTCAGGAGGGTGAGGAGGGAGAATCACTTCAGCCCA
ATACGTTAAGGCTACAGTGAGCCATGATTGCACCACTGCACTCCAGCTTGGGCAATAGAGCAAGACCTG
TCCCTAAAGAAAACAAAAAATCTGATGCTGCATTTTCAGACTGGAGGCTAACTGCACCTCTTCTGGCTTC
TCTCAGGGCACTTCTTCACCATCTGCATGGCCTTCTTGGTTCTCAGCTTAGCTAAGTCCATCGTGTGGT
CAAATTCCTCCATGATGAGCAGCGTGGTGGACAGGAGCAGCCCTTCTTGTGCCTTCGAGGGGACACCGAT
GCTGACAGGCCTAGAGTGGAACCCAGGGCCCAACGTGCTGTGGTAACAGGTGTGTGAGAAGCCTTGTGTT
TCTCCCCCGTCTGGATTGATCACCTTAAAAATTCATTCCCGTTGATGATGTAAGGTATTGCGTTGGCC
TATGTGAAAAACCTACAACAACCTGCTTCTAGCCTGGGTGTGGCATTATATATTATCTCTCTGGAGACTG
AAGGCTGCCTGCTTCTGGCTTTCTAGAAAGTCTCATTTTGTGTTTCTGTTTGTGTTTGGTTTGGTTT
TTGAGACAGGGTTTTGCCATGTTGCGCAGGCTGGTCTCGAACTCCTAGGCTCAGGCGATCTTCCCTCCTT
TGCCCTCCCAAGTGTGAGATTGCAGGTGTGAGCCACTGCGCTCAGCTGAAAGTCTAATTTTGGCTTGAA
TTTCAGGCCCTCAGTTACTCTTTGTTTGTGACAGAATCTCGCTCTGTCGCCCAGGCTTGAGCTGGCA
CAATCTCTGCTCACTGCAGCCTCTGCCTCCAGGCTCAAGCTATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGC

TAGGACTATAGGCGTGTGCCACCATGCCTTGCTAATTTTTGTATTTTTAGTAGAGACAGGGTTTCACCAT
GTTGGCCAGGCTGGTCTCGAACTCCTGACCTCAGGTGATCCACCCACCTCGGCCTCCCAGAGTGCTGGGA
TTACAGGTGTGAGCCTACCGCACCCAGCCTATTTGTTTGTATTTTATCCCCAATTTTAAACCAGTTACCCAA
AGTGAAGTGAAGCATTGATTTTCTAGTGTCTTAATGTGAACAAGTATAAGAATCATCCCAGCCCCCTAAAGCTCCTA
CTGAGTCCATTTGGGCTGACCTCTAACTCAGAACTCTCCTGGACGGATCTAGCACACATACACCCTGCT
TACATAATAACAGCTCTGACGTGTTCTCTGAGGCTTCTCCTGCAGTACAACCTTTGCCTCGCCTAATCGGGTG
GGGAGAGTACCCAACCCAAACACAACCCACTGCTCAGTTTCACCTGCAACTTTCCTTGAAGGATGAGGCC
ATCAGCTTCAAGAGAAAGTCCAGGTGGGTCTTGGTAGTCCCTGGCTCAGGAGGAGTCTGAGGAGTCTGAGGAGT
CACAGAGTCCCTCGCTGATGGAGAGCACCTGGCCAGCCAGGAACCTTGAAGGAAGTCTGGTTCGACGCTT
CAATCTATCAGCAACTACCTCCAACTCAGGACCAGACAGACCAACAGGAGGCAGAGTGGCTGGTCTCTCC
TGTCCCGCTTTGACCGACTGCTCTTCCAAAGCTACCTTTTCATGCTGGGGATCTACACCATCACTCTGTG
CTCCCTCTGGGCACTGTGGGGCGGCGTGTGAAGACTGAAGTGTCTTTCAGTAATTGTGCTGGCACTTAGG
AGAGAGAGGAGGGGAATAATAGTGGGTAAAAAGCTTTCTGGGTGGGTGTGGTGGTTCTTGCCTATAG
TCCCAGTGCTTTGGGAGGCCATAGCAGGAGGATTGCTTGAGCCAGGAGTTCGAGACCAGCCAGAGCAAC
ATAGTGAGACCACATCTCTACCAGTAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
GGCATAGTGGCTCATGCCTGTACTCTCAGCTACTTGGGAGGTTGAGGTGGGAGGATTGCTTGAGCCAGG
ATTTCAAGGCTGCAGTGAGCCATGATTGCACCACTGCACCCAGCCTGGGTGACAGAGCAAGACCTGTC
TCAAAAAAATAAATAAAGGCTTTCTGCCTTCATTGCCTCTCCATTGAGTCCAGCTTCATACACCTAA
TAGTCTGCTGTGTGACCCAAGGATCATATGTTTCATGAAAATGTATAAACAGTATGAGTATACAGTAAAAA
AGTAACTTTCTTTCTTATCCCAGTCCACTCACCCAAAGCAACCACTGTTAGTAATTTCTTCCAGAAGAT
TTCTAGGCACACACATGCATCTATGTATGGTTAAGCAGTTTTTTAAAAAGTGTAAAGATAGCTCCATCTTC
CAGCCCTGCCTTGGCCATTTATTTCAGTCACCCATTCAACAAAACCTTTATTGAGTATTAAGTCTTAGGCA
TTATGTTAGGCACACCAGAGAATACAAAATAAGTCAGCACAGGTTATTATTCACTTGTTGTGATTCCCAT
GGTCAACCTGGTACCAACCAACCAGAGCATAAAATTCCTGCCATATCCCTCACCTTCTGAGGCTCTTGTT
ACCACCTCCCAGTCAAGTCCACTGCCTCCACCTCTTCTGTGCCCCCTCAGCAGTGCATCCCCACTGGA
GAGAACCAGGTGCCAAGGCTTTTCTTTTGTGGAGCAGAGTCTTGCTCTGTCCAGGATTTGGAGT
GCAGTGGTGCAATCTTGGCTCACTGTAACCTCCACCTCCCGGGTTCAAGCAATTTCCCTGCCTCAGCCTC
CCGAGTAGCTGGAACACTACAGGTGCATGCCACCACACCCAGCTAATTTTCTGTATTTTGTAGTAGCAGGTGCC
AAGGCTTCTAAGCCAGTCTAGCACATCATTTAGTCCACACACAAGGGCAATGCATGGAGTGGGAGGAC
AGGCATAGTTCACGGTCTTTTGCTTCAAGGAAGTTATAATCCACTGTCCCTGAACTAGTCAGCTAGGAAA
TACTACACACTAAGTTGCTTTAAGAGAGATTTATTTTCTCACCAGTCTGGAAGCTAGAAGCCTAAGATCA
AGGTGCAAACAGGGTGGGTGGCTTTCTTCTGAGCCCTGTCTTGGCTTGCAGGTTGCTGACTTCTTGCTT
TGTTTTACATGACCTTTCTCTGTGCATGCTCATGTCTGTGTCCAGATTTTCTCTTCAACAAGGGCAC
CAGTGTGTTGGTTTGGGTCCATCCTAGTGACCTCTTTTAACTTAATCACTTTTTTCAAGGCCCTATG
TTCAAACAGTCATATTCTGAGTACTAGGGGTAGGATGTCAACATATGAATTTTGGGGAGTGGGCAGCAG
ACAAAGGGGACATATTTTCAGCCATAACACTAGTGATTCCGGAGGTTTAGCAAGTCCAGATTCTGCAGAG
TAGGCTGGCAGGCTGGAGACCTGCTGACAGTCTTAACGCTGTGAGTAGAAGACACAAAAAGTCCAAAAAGCT
GTTTGCTAGAACTTTTTCCAGCACTAAAATTGCCTTTAGAAAAATCTGCCCCCTCCATCCCCCAAAG
AAAAAGAATTTAAATTCAAACAGCCTTTACCTGCATCTTCCCTCTCTCATTACCTCCCAGTTAGTGCTCA
GCGCCAATTGTCCATGAAATTCCACTGCTGCTGTTAATGAAATGAGGAACATAAGAAGTTTGTGAACAGG
AAGTGTCCATGCAAACCTCCACCTGTTTCTTCTCCTCACTTCTCTACTTTCTACTGCTGGCCTCCTCTGCTT
TGACGTGCTCAGTTAGGCATCAGGTCCTGATGTACCTTAGCTTGCCATCCATGTGATTTCTGGCTTTC
TCCACTTCTCTCCTCAGTTAACAGAGGAGGAAAGGAGGAAAGGCTGAGGTGAATCCTCACTGTGGG
TCTCTCTCTTCCCCAATACTGTCTTAGAGAAAGCACCAGTGTGAGAGTCAAGGAGTCTGATGATTACGGT
CCTGGCTCTGCCATTACCTAGCCAGGGGACCTCTGTGAGCTTAACCTTCTCAGACTTCAACTTACCTTATT
TGAAATTGGGGCTGTTTATATTTGCTCTACCCCTATCAAAGAGTTATGAGGATCAAAATGAAAAATGTA
TTGAACAATGCTTTGAAAAGTAAATAATGGGGCGTGGTGGCTCACGCCTATAATCCCAACACTTTGGGAG
GCTGAGGTGGGTGGATTACCTGAGGTGAGGAGTTTGAAGCAGCCTGACCAACATGGAGAAACCTGTCT
CTACTAAAAATACAAAATTAGCCAGGCGTGGTGGCACATGCCTGTAATCCACCTACTCGGGGGGCTGAG
GCAGGAGAATCGCTTGAACCCAGGAGGTGGAGGTTGCGGTGAGCCGAGATCGTGCCATTGCACTCCAGCC
CGGGCAACAAGAGCTAACTCTATCTCAAAAAAAAAAAAAAGTTTAAAGTGCTTTGGGAAGGGGGAGGGA
TAGCATTAGAAGATATACCTAATGTTAATGGGTGCAGCACAGCAACGTGGCACGTGTATACATATGTAAC
AAACCTGCACGTTGTGCACATGTACCCTAAAACCTTAAAGTATAATTTAAAAAAAAGTAAATAATGCATCA
CAAAATAAAGATAAGACCTGCTTGCTATCAACAGATGGACTCCAGTCTTGAGTTTTTGGTGTGGGATCTG
ATTTCCAGCTCCCTCTATCAGAATCCAGTCATGGGTCTGGTACTCTCCTCCAGTTGTTCCACTATTATA
GGATCCAAAGGCCAAGGGCTGAAGTCATCACATGCCTCCTTACAGAGAACTTGTGTGGCAGGGGTTGCC
AAAGGGACTTCCCAGTCCATCTCACATGAAGCTCACCTTTGTTCCATTGCGAGATGACATTGCCAGGTT
CTTTACATCAGCCTCTAACAAGCAGCCCTTTAAGAGTGAAGCCTGGCCGCCAACTGGTCCCCGGTACAC
TTCCTTCTGCTAGTGGCAAGTGGCCTTAATCACAACCTGCAGCCAGAACTCATTCAAAGCCCCAGAGTCA
GGCTGCATCCTGAAGCAATGACATTGTAAACCAAAAAATTAATTTAAGGGCCCCCAACCATCTGAAT
GAGCTCCATCCTTTTCAGTGAGGACATCCCAAGACTGGGGTTACAGGCCATGATGGGCAGCGGGGTCGGA
AATGCCTCATGATGCCCTCTCTCTTTTCGGAATTCAGGAAAAGTTGACCAGCACCAGCATTAACATCAAT


```
ACAGATCTTAAGTCTGATAAGAAACATTTACAATCTGGCTGGGCGCAGTGGCTCATGTCTGTAATCCCAG
CACTTTGGGAGGCCGAGGCGGGTGGATCACTTGAGGTCAGGAATTCAAGACCAGCCTGGCCAACATAATG
AAACCCCATCTCTACTAAAAATACAAAATTTAGCTGGGCATGGCGGCACATGCCTGTAATCCCAGCTACT
TGGAAGGCTGAGGCAGAAGAATTGCTTGAACCTGGGAGGTAGAGGTTGCGGTGACCTGAGATCGCACCAC
TGCACTCCAGCCTGGGCAACAGAGTGAGACTCTGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAGAAAACATTTACA
ATCTACTCTCTCTGAAGCCTGCTGCCTGGAAGCTTCATCTGCATGATAAACTTTGGTCTCCACAACCAC
TTACCATAATCCAGACATTCCTTTCTATTGACAATAACTCTTTTAAACAATAGCCAATCACAAAAATTTT
AAATCTACTTAGGATCTGAAACCCCTTGCCCCACTGGCTTTAAGTTGTCCCCCTTTCTGGACGGAATCA
ATATGTATCTTAAATGTATTTGATTGATGTCTCATGTCTCCCTAAACGTACAAAACCAAGCTGTGCCCT
GACCACCTTGGGCACATGTTCTCAGGGTCTCCTGGGGGCTGTGTCACTGGCCGTGGTCACACATATTTGG
CTCAGAATAAATCTCTTCCAATATTTTACAGAGTTTGACTCTTTTCTTCGACAACATCATGAACAAATGG
CACTACAGATCTCCTCCTGGAATAGTGTCCCTCTGTGGTGGGAGGAATATGGGGTGCCAGCAGCCCTTAT
TTGCAGAGCAGCTTTAGCTCAGCCCCTCCAAATGTTTCATACATTT
```

7.2 Humane mRNA-Sequenz AF169255 und AF080582

LOCUS	AF169255	1922 bp	mRNA	linear	PRI 24-OCT-1999
DEFINITION	Homo sapiens 5-hydroxytryptamine 3 receptor B subunit (5-HTR3B) mRNA, complete cds.				
ACCESSION	AF169255				
VERSION	AF169255.1 GI:6103620				
KEYWORDS	.				
SOURCE	Homo sapiens (human)				
ORGANISM	<u>Homo sapiens</u> Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.				
REFERENCE	1 (bases 1 to 1922)				
AUTHORS	Dubin,A.E., Huvar,R., D'Andrea,M.R., Pyati,J., Zhu,J.Y., Joy,K.C., Wilson,S.J., Galindo,J.E., Glass,C.A., Luo,L., Jackson,M.R., Lovenberg,T.W. and Erlander,M.G.				
TITLE	The pharmacological and functional characteristics of the serotonin receptor				
	5-HT(3A) receptor are specifically modified by a 5-HT(3B) subunit				
JOURNAL	J. Biol. Chem. 274 (43), 30799-30810 (1999)				
PUBMED	10521471				
REFERENCE	2 (bases 1 to 1922)				
AUTHORS	Erlander,M.G., D'Andrea,M.R., Pyati,J., Zhu,J.Y. and Dubin,A.E.				
TITLE	Direct Submission				
JOURNAL	Submitted (15-JUL-1999) Gene Discovery, R.W. Johnson PRI, 3210 Merryfield Row, San Diego, CA 92121, USA				
FEATURES	Location/Qualifiers				
source	1..1922 /organism="Homo sapiens" /mol_type="mRNA" /db_xref="taxon:9606" /tissue_type="small intestine"				
gene	1..1922 /gene="5-HTR3B"				
5'UTR	1..141 /gene="5-HTR3B"				
CDS	142..1467 /gene="5-HTR3B" /note="ligand gated receptor subunit; serotonin 5-HT3 receptor B subunit" /codon_start=1				

/product="5-hydroxytryptamine 3 receptor B subunit"
 /protein_id="AAF03691.1"
 /db_xref="GI:6103621"

/translation="MLSSVMAPLWACILVAAGILATDTHHPQDSALYHLSKQLLQKYH

KEVRPVYNWTKATTVYLDLFDVHAILDVAENQILKTSVWYQEVWNDEFLSWNSSMFDE

IREISLPLSAIWAPDIIINEFVDIERYPDLPYVYVNSSGTIENYKPIQVVSACSLETY

AFPFQVQNCSTLTKSILHTVEDVDLAFLRSPEDIQHDKKAFDNDSEWELLSVSSTYSI

LQSSAGGFAQIQFNVVMRRHPLVYVVSLLIPSIFLMLVDLGSFYLPNCRRARIVFKTS

VLVGYTVFRVNMSNQVPRSVGSTPLIGHFFTICMAFLVLVSLAKSIVLVKFLHDEQRGG

QEQPFLCLRGDTDADRPRVEPRAQRAVVTESSLYGEHLAQPGTLKEVWSQLQSIISNYL

QTQDQTDQQEAEWLVLVLSRFDRLLFQSYLFMLGIYTTITLCSLWALWGGV"

3'UTR

1468..1922

/gene="5-HTR3B"

ORIGIN

```

1 ccacgcgtcc gtaaggatag catcaactgg caaacggaga aggaggagaa cagagtggag
61 aggaaccctg ttaggagaaa ttgagcggca ttccatctgg taggcaagtt tgcattttctc
121 ctttttgga tctgcccagg aatgttgtca agtgtaatgg cttccctgtg ggcctgcatc
181 ctggtggctg caggaattct agccacagat acacatcatc cccaggattc tgctctgtat
241 catctcagca agcagctatt acagaaatat cataaagaag tgagacctgt ttacaactgg
301 accaaggcca ccacagtcta cctggacctg ttctgccatg ctatattgga tgtggatgca
361 gagaatcaaa tattaagac aagtgtatgg taccaagagg tctggaatga tgaattttta
421 tcctggaact ccagcatggt tgatgagatt agagagatct cctacctct aagtgccatc
481 tgggcccccg atatcatcat caatgagttt gtggacattg aaagataccc tgaccttccc
541 tatgtttatg tgaactcatc tgggaccatt gagaactata agcccatcca ggtggtctct
601 gcgtgcagtt tagagacata tgcttttcca tttgatgtcc agaattgcag cctgaccttc
661 aagagcattc tgcatacagt ggaagacgta gacctggcct ttctgaggag cccagaagac
721 attcagcatg acaaaaaggc gtttttgaat gacagtgagt gggaaacttct atctgtgtcc
781 tccacataca gcatcctgca gagcagcgct ggaggatttg cacagattca gtttaatgtg
841 gtgatgcgca ggcacccccct ggtctatgtc gtgagctctg tgattcctag catctttctc
901 atgctggtgg acctggggag cttctacctg ccaccaact gccgagccag gattgtgttc
961 aagaccagtg tgctggtggg ctacaccgtc ttcagggta acatgtccaa ccaggtgcca
1021 cggagtgtag ggagcacccc tctgattggg cacttcttca ccatctgcat ggccttcttg
1081 gttctcagct tagctaagtc catcgtgttg gtcaaattcc tccatgatga gcagcgtggt
1141 ggacaggagc agcccttctt gtgccttcga ggggacaccg atgctgacag gcctagagtg
1201 gaaccaggag cccaacgtgc tgtggttaaca gagtcctcgc tgtatggaga gcacctggcc
1261 cagccaggaa ccctgaagga agtctggtcg cagcttcaat ctatcagcaa ctacctcaa
1321 actcaggacc agacagacca acaggaggca gactggctgg tcctcctgtc ccgctttgac
1381 cgactgctct tccaaagcta ccttttcatg ctggggatct acaccatcac tctgtgctcc
1441 ctctgggcac tgtggggcgg cgtgtgaaga ctgaagtgtt cttcagtaat tgtgctggca
1501 cttaggagag agagaggggg aataatagtg ggttaaaaag ctttctgggt cgggtgtggt
1561 ggttcttgcc tatagtccca gtgctttggg aggccatagc aggaggattg cttgagccca
1621 ggagtctgag accagccaga gcaacatagt gagaccacat ctctaccagt aaataaataa
1681 ataaataaat aaataaataa ataaataaat agctgggcat agtggctcat gcctgtactc
1741 tcagctactt gggagggttg ggtgggagga ttgcttgagc ccaggatttc aaggctgcag
1801 tgagccatga ttgcaccact gcacccagc ctgggtgaca gaacaagacc ctgtctcaaa
1861 aaaaaaataa aataaaaggc tttctgcctt caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
1921 aa

```

//

LOCUS AF080582 1500 bp mRNA linear PRI 04-FEB-1999
DEFINITION Homo sapiens 5-hydroxytryptamine 3 receptor B subunit precursor,
mRNA, complete cds.
ACCESSION AF080582
VERSION AF080582.1 GI:4218948
KEYWORDS .
SOURCE Homo sapiens (human)
ORGANISM Homo sapiens
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;
Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1500)
AUTHORS Davies,P.A., Pistis,M., Hanna,M.C., Peters,J.A., Lambert,J.J.,
Hales,T.G. and Kirkness,E.F.
TITLE The 5-HT3B subunit is a major determinant of serotonin-receptor
function
JOURNAL Nature 397 (6717), 359-363 (1999)
PUBMED 9950429
REFERENCE 2 (bases 1 to 1500)
AUTHORS Hanna,M.C. and Kirkness,E.F.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (27-JUL-1998) Department of Molecular and Cellular
Biology, The Institute for Genomic Research, 9712 Medical
Center
Drive, Rockville, MD 20850, USA
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1500
/organism="Homo sapiens"
/mol_type="mRNA"
/db_xref="taxon:9606"
/chromosome="11"
/map="11q23.1"
CDS 68..1393
/note="serotonin-gated ion channel subunit"
/codon_start=1
/product="5-hydroxytryptamine 3 receptor B subunit
precursor"
/protein_id="AAD12242.1"
/db_xref="GI:4218949"

/translation="MLSSVMAPLWACILVAAGILATDTHHPQDSALYHLSKQLLQKYH
KEVRPVYNWTKATTVYLDLFDVHAILDVDAENQILKTSVWYQEVWNDEFLSWNSSMFDE
IREISLPLSAIWAPDIIINEFVDIERYPDLPYVYVNSSGTIENYKPIQVVSACSLETY
AFPFDVQNCSLTFKSILHTVEDVDLAFLRSPEDIQHDKKAFLNDSEWELLSVSSTYSI
LQSSAGGFAQIQFNVMRRHPLVYVVSLLIPSIFLMLVDLGSFYLPNCRARIVFKTS
VLVGYTVFRVNMSNQVPRSVGSTPLIGHFFTICMAFLVLSLAKSIVLVKFLHDEQRRGG
QEQPFLCLRGDTDADRPRVEPRAQRAVVTESSLYGEHLAQPGTLKEVWSQLQISISNYL
QTQDQTDQQEAEWLVLSSRFDRLLFQSYLFMLGIYTITLCSLWALWGGV"
ORIGIN
1 gagaaattga gcggcattcc atctggtagg caagtttgca tttctccttt ttgggatctg
61 cccaggaatg ttgtcaagtg taatggctcc cctgtgggcc tgcatacctg tggctgcagg
121 aattctagcc acagatacac atcatcccca ggattctgct ctgtatcatc tcagcaagca
181 gctattacag aaatatcata aagaagtgag acctgtttac aactggacca aggccaccac
241 agtctacctg gacctgttcg tccatgctat attggatgtg gatgcagaga atcaaatatt

```

301 aaagacaagt gtatggtacc aagaggtctg gaatgatgaa tttttatcct ggaactccag
361 catgtttgat gagattagag agatctccct acctctaagt gccatctggg cccccgatat
421 catcatcaat gagtttgtgg acattgaaag ataccctgac cttccctatg tttatgtgaa
481 ctcatctggg accattgaga actataagcc catccagggtg gtctctgctg gcagttttaga
541 gacatatgct tttccatttg atgtccagaa ttgcagcctg accttcaaga gcattctgca
601 tacagtggaa gacgtagacc tggcctttct gaggagccca gaagacattc agcatgacaa
661 aaaggcgttt ttgaatgaca gtgagtggga acttctatct gtgtcctcca catacagcat
721 cctgcagagc agcgctggag gatttgcaca gattcagttt aatgtggtga tgcgcaggca
781 cccctggtc tatgtcgtga gtctgctgat tcctagcctc tttctcatgc tgggtggacct
841 ggggagcttc taccctgccac ccaactgccg agccaggatt gtgttcaaga ccagtgtgct
901 ggtgggctac accgtcttca gggtaacat gtccaaccag gtgccacgga gtgtaggagag
961 caccctctg attgggcact tcttccaccat ctgcatggcc ttcttggttc tcagcttagc
1021 taagtccatc gtgttggtca aattcctcca tgatgagcag cgtgggtggac aggagcagcc
1081 cttcttggtc cttcgagggg acaccgatgc tgacaggcct agagtggaaac ccaggggccca
1141 acgtgctgtg gtaacagagt cctcgctgta tggagagcac ctggcccagc caggaaacct
1201 gaaggaagtc tggcgcagc ttcaatctat cagcaactac ctccaaactc aggaccagac
1261 agaccaacag gaggcagagt ggctggtcct cctgtcccgc ttgaccgac tgctcttcca
1321 aagctacctt ttcattgctg ggatctacac catcactctg tgctccctct gggcactgtg
1381 gggcggtgtg tgaagactga agtggtcttc agtaattgtg ctggcactta ggagagagag
1441 gggggggaat aatagtgggt taaaagctt tctgggtcgg gtgtggtggt tcttgctat

```

//

7.3 Promotorregion der Ratte

ref|NW_047799.2|Rn8_WGA2323_4:21846224-21851224 Rattus norvegicus
 chromosome 8 genomic contig, reference assembly (based on RGSC v3.4)
 GI62654011

```

CTTTGAGAATTCAGACCCAAGCTCTAGGAGAACCCTCAAAAAGGTAGAGAATAAACATAAGATGAACAGA
AGTACTGTGCTAGGAGTCGCTGACAAAGACAGGTTTCTTTTCTCTTTGTACACAGTTGGGATGAAGGAA
AGGACGCATTACCAGATTAAAGAATGGGTTTTAAGCTGAAGGGATTGTGCGACCCCATAGAACAACAATG
CCAACCAACCAGAGCTTCCAGAGACTAAACCATTACCCAAAGACTATACATGGACTGACCTTGGGCTCCA
ACTGCATAGGTAGCAATGAATAGCCTTTTTTGGGTCAACAGTGAAGGGGAAGCCCTCGGTCTTGCCAAAG
TTAGACCCCAAGTGTAGGGGAATGTCAGGGTGGGGAGGCAGGAAGGGGTGGGTGGGTGGGTGGGTGGG
TGGGGGAAGGGGACAACATTTGAAATGTAAATAAAAAAATCCAATTAAGGAGTGGGTTTTAAGACAAAG
AGAATGAAACATGCCAGGTAAGGGTAGGGACAACCCATAGATTCTTGGTTAATCCACATTTTTAAAAAA
TCAGTTGCATCCTAACTAAAACAGTCGAATTCAGTAGAGTCAATGCCACTGTTGATGTATCGTTCATAC
ATTAAACACACATAACCGCTAAAGTAGTTTCATAGAAATCGTGACTTAAACTTACATGCCTTTACAT
CTGCCTTCAGCAGTTAACTGGCCGCTTCCGCAGTTTCTGCAAAAGCTGGATTCAAACACTGTGATATCAA
ATGATACACAGCTGAGAGCAATCCATGGGACTCTTCTGCTCTGCTAAAGGTTTATAATAAAGCCAAGG
TTATCTGGGATCCTAAAACACATTATCTGTGCATATCTGAAAGAGATTGCCCCGAACAACATAAAACCACC
TGAGTGAGCTGGATTTCTTCAGAAGAGAACATTTTCCCGTGGAAGTAATGTTTTGGAGTGAATTTTCACC
TGTGTAGACGGAGGTGGGGGGGGTGGGGGGTGGCAGGGGAGTGTGAGAGACACATCACTGGTCTCTGCA
AAGCTTCATAGGGCTAGCATTTAACAGATCATGAGTCCAAAGGAACAGATCTGAGGTGTTCCCGGCACAG
TGTGGGCACTACAGACAGCGCCCGGCAGAATCATTACAGGACTTACCTACGACAGCCACCAGGAGGCAG
GACCACAGAAGAATCATCGCACTTGCCTATTGTTCTGGGGCAGGTACCAGAGACGAGCGATGACTGCGGT
CGGGCGGTGCGGCGAGCGAGAGCACTGCTCGACCTTGCATCTCTCAGTGCCCCCTCCACCCTCGTCTCCTG
TCTGCTCACTTGTGGTAACCTTTGGTGCGATTTTGTAAACATCCGACTGGACAGGCACATGTGCACCGCAC
AGAGGTTTGGGGATTAATGCCTTCACGAAGCCACAAGCTTCTCCATTTGGCTGTGCCCTAGGATGATGG
CCAAGACTCCATCTCCCTTACAGGAGCCAGCTAAGTGAATAATGCAATTTTAGAGGGGGCCCCAAGGAGA
GGAAATTCCAGGCTAATATGATTTTCTTTCCAGCCTTTACCTAAGGCAATGTTCTTGCTGGCATTTCAGGA
CCCTAATTTTCATTAATAATTGAGATCCAGATTGTTGCCTTAAATCAGACGTAGGCAGGAACATCTTCGGT
CTCTGGGAACAGTCACTGGGCTCTTGAGTTACAAGCAGCTAATGGGAACCTGGTATTGTCTAATGAGCAT
CAACTACAAACAATACAGTGGAAAGAGTGCTTTTGTCTGCTAGGCCCCCTTAAATTAAGGGAAGCATTG
ATTTTGTATATATAGGAATGCTTTTAAATTTTCACTGCGCACAGTCCACAAAGTAACTCAGACAAGATG
CTTCTAGGCTTCTGGAAGATGAGAACTATTAATGTTTAACTCCTTCGATAAAAGTTTTTTTTTAATGTC
CCTTTAAATTTATTTTTATTTTATTTTATTTTGTATGTGGGGGTGGACAAGTGCTTTGGGGTACATGGAGAC
TGTGGGTCTGGGGACTCAAATGGGGTCCCAATCAAACCAAGTTGGATTGTGAGGCTTAGGGGGGAAGC
ACCCCTTCCCCATGAGCCATCTTGTGGCTTGTGTTGCTGTTTCGATGGATTGAATATGGTTACTTTTTGTG
ACATTACCTTCTCTTCTGCTACTGAGCAGGAGTCCCTCTAGTGTCCGTGTACCTGTGCACACCAGTG
TGCAGACACCGCTTCCACATACACTAAGAAATAAATAAATAATGTCTTGTGCGGGGCCAGTGTAGCAG
CTCACAATTATAACCTCAACACTTGAGAGGAGGAGGCAGGACCAGGAGTTCAAATCCAGCCTTGACTACA

```

GGAGAGCTTGACTTCTGGCCAGCCTGAGCTACAGGAGACCTTGTCTCAACAAAGAAGAAATGAAAAGAAG
CAAGCTAATCCCCCATTAAACAAACAGAGATAGTCCCCCCCCCCTGGAGACCGAACCCAAGGCCTTGCG
CTTGCCACTGAGCTAAATCCCCAACCCCTAGAGATAGTCTTTTGATGTGGTAACTGCACACTAGCTAGTCA
AGGCTGCAGCTAATTGGCTGTGAAAGAGTTGTGTGGCTGGAGGTGGGAGAGGAGAGCTCTCTCCACCAGC
CTTCTGATTTTGTGGTGAGCTTGGCTCACCAAGAATCGATCTGGCCCCCTTCTGTCTGCTCCTGACAGT
TCTGAGAGTCTGCTTTGGCTCATGGGGAAGAATCTGGACAAGAGGGAGTACAGCTGGGTGGTAGCGTCT
TTCTAGGGGAGGGATTGGGAAGCCTCCCCCTTGTGCAGAGGTTTGAAGTGAAGTGGTATGCTGCTGCTGCT
CTTGCCACACATTCTAGTGTGTCTGACTCTAAGGCAGACCCTTCGGGAACATTCCCTCCCTCTTTTCT
TTGCACTTTTCTCATGTGCCCCTCTGTTACTGCAAGGCCATTGCTAATGATGTGTAATGCAGGTCCATTAT
GACCTTCGTTAGCTGATTTAACAGCAGTCTGGCGCTGCTACCTGCCACAGCTCTTGGCTGCAGCCTCCGG
CCAGGAGTTTTCGTGGGTACCGTGTCTTCAGGAGAGTTTTCAGTGCCTCAGCTCTCTCTCTTTGCTAACT
CTCCCATATTTTACTCAATGGTTTTAGATTCTCAGCTAAACCTTTTCAGTCCCCCAACCCTACCCCCAGCC
TCCAGACTGCTTCTTACTACATAGATCGTTCTGGCAGGCTTGGAACTCATTATGTAGACAATTTTTTTTCT
ATTGATTTTATTTTCTGTGTACGAGTGTCTTGCCTGTATTTGTGTGTGTATGTGCGTGCCTACAGGCCT
GCCTAGTGCCTAGAGGTGAGAAAGGGTGCTGCGTTCCCTGAAACAGAATGGTGATGGAACACCTTGTGGG
AGTTGGGAAGTGAACCTGGTTCTTTGGCAAGAGCAACAAGTGCTGTAGACCATGGAGCCAACCTCTCCATG
CCTCTCAAATCAGTACATTTAAGATGCAAAGTTGGAGTCAAGAGATGTGTGTGCATGTGTGTGTGTATGT
GTGCTGAGGCTATAGGCCCCGTACCTCAGAATCCTCAAGGAATAACACTGGGGCAAAGTAAGCCAAAACCT
CAAGTAAGGCTTGAGTCTGCCATTCTCTAGCAGCAACTCAGGCCATGCCCACCACCATTAAGAGAATCGC
AAGAAGAATATTCTTTTGAAGCCCCCTCTCCACAGCTCCAGAAACCCCTGTACCATGCTTCTCCATTTGT
GAGCAGGACGTGGCACCTCTTAGATGGACCAATGTCTTCTGGAAGAAGCAGGGAGAGAGTGTCTATTATG
CAAACATAATAAGGAAGTGTTTATTATGCAAACGGCGACTGAGTTATGTGTCTTTAAGACTACTAAATA
GTTTTTAATTACTGCTATATCAGTAAATCCCATAAATATGCAAATGCAATTAGTTTACAAAAATAGGCCTT
AAATATCTTTATTTCTCTCAACAAAGTTCTTTGAAGTTAATCGCTAACTCTCTTTGTTTCTGCTTGG
CAGTTGGGCTAAAATTGACAGGAATTTTGACAGATGTACATATACTCAAGGAGAACCAAGGTTTCTGAGC
ACATCTGGTCTGTGGAGGGAGGAGGAAAGCGGACCGAATCCGTGTCCACTGAGTCCGCCCACCCCTCA
GCGCCCCCTGCAGGCCCTTCTTGTGTGTGTGCTTTTCTTTGGCTTGGAGATAGCATCTTACCCTGTAGG
CATTGACCTCACAGCCATCCTGTGGCCTGAGGATGGCCTCGAACTCCTGATCCTCTCGACTCTGTTTCTCT
GAATTACAGGTGTGCTCCACCATACTGGTGCTGGTGACCAAACTCTGTTGATCTGTGAGCGTTAGGTAA
GCACTCGACCAACGGAGCTACACGCCACTTCCACCCCATAGGTCATTATCATTACTCCACGAAATAAAT
ATCAACCTCACTACTGAGACGGCACGTCAAATCCAAGCTCACACTCTCTGTTTGGAACTTGAATTTAATA
ATACATATTTTCTGGTTATTAACGAGTCTGTTTCGTTAGCACCGGCAGTCATGATGGTTTGTGCCTATAGT
CACAGCTCTTGGCATACCAATTCAAGAAATTACAGCGGTTCAAGGCCAGACTGTGTTACAATGCCCTAA
GATATACATACCCACAGGCCAAACCAATATAGGCAACCCCTTCAATTGAATGTCTCTTTCCAAGTGTTCCTA
GGTTGTGTTTTAGTTGATAATTAAAGCTAACGTACACCATGGAGATTGCAAAAGTGGTCTTGTGTGTCTC
TGATGTTCTAGCACAGAACTGAAGAATACTCAGTAAAAATCCAGAGGGGTTGAAGGAAGAAAAAGTGAGC
AAACCAAAAGAAAGGAATTTTGGCTTATTATGAAAGGGCATACTTAGAGGGACCCAGCTCTCTCAGAAC
CACACCCAAGATGCTATCTTTTTTGCCACTAT

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Cornelia Meineke

Geboren: 30.07.1975 in Freiburg i. Br.

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1982 – 1986 Grundschule Merzhausen

1986 – 1988 St. Ursula Gymnasium Freiburg

1988 – 1995 Goethe Gymnasium Einbeck

1992 – 1993 Highschool Novato/Kalifornien (USA)

05/95 Goethe Gymnasium Einbeck, Abitur mit Note 1,4

Studium

10/95 – 10/99 Studium der Pharmazie an der Philipps-Universität Marburg

Famulaturen:

Rosenapotheke Nörten-Hardenberg März 1996

Krankenhausapotheke der Universitätsklinik Mannheim März 1997

10/99 2. Staatsexamen mit Note 1,5

Pharmaziepraktikum

11/99 – 04/00 Krankenhausapotheke des Basildon Hospital/England

05/00 – 10/00 Marien-Apotheke Hannover / Belieferung Kinderkrankenhaus Hannover.

11/00 Pharm. Prüfung Gesamtnote 2,0 und Approbation als Apothekerin

Berufliche Erfahrungen

12/00 Apothekerin in der Rats Apotheke Einbeck

01/01 – 03/01 Apothekerin in der Markt Apotheke Tiengen

04/01 – 04/02 Apothekerin in der Greifen-Apotheke Kirchzarten

04/02 – jetzt Nebentätigkeit als Apothekerin in der Rats Apotheke Einbeck

07/02 – 03/05 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Klinische Pharmakologie,
Georg-August-Universität Göttingen

04/05 – 06/06 Stipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Graduiertenkolleg 1034
in der Klinischen Pharmakologie, Georg-August-Universität Göttingen

07/06 – jetzt Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Klinische Pharmakologie,
Georg-August-Universität Göttingen

Allgemeine Veröffentlichungen

- 09/2004 Mühlinghaus T, Eis D, Birkner N, **Meineke C**, Brockmüller J.:
„Untersuchungen zur Suszeptibilität bei Multipler Chemikalien-
Überempfindlichkeit (MCS)“
Umweltmed Forsch Prax 9 (4) 2004
- 01/2005 Eis D, Dietel A, Mühlinghaus T, Birkner N, Jordan L, **Meineke C**, Renner B:
„Studie zum Verlauf und zur Prognose des MCS-Syndroms“
WaBoLu-Hefte, ISSN 0175-4211 oder unter
<http://www.umweltdaten.de/publikationen/fpdf-l/2875.pdf>
- 01/2006 Petry F, Ritz V, **Meineke C**, Middel P, Kietzmann T, Schmitz-Salue C, Hirsch-
Ernst KI: “Subcellular localization of rat Abca5; a rat ATP-binding cassette
transporter expressed in leydig cells”
Biochem. J. 2006 Jan 1; 393(pt 1): 79-87

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Ingo Rustenbeck danke ich für die Betreuung und Beurteilung dieser Doktorarbeit und dafür, dass er es mir ermöglichte an der Technischen Universität Braunschweig im Fachbereich für Lebenswissenschaften zu promovieren. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Jürgen Brockmöller für seine vielfältige Unterstützung. Ohne die Möglichkeit in dem hervorragend ausgestatteten Labor der Klinischen Pharmakologie forschen zu dürfen, wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Gleiches gilt für die finanzielle Sicherheit während der gesamten Zeit der Dissertation.

Herrn PD. Dr. Rolf Kaiser verdanke ich die interessante Fragestellung und die Laborbetreuung zu Beginn meiner Forschungszeit. Ganz besonders hervorheben möchte ich meinen Freund und Kollegen Dr. Mladen Tzvetkov. Er hat mich in theoretischen und praktischen Fragen mit seiner hervorragenden Fachkenntnis und seiner mitreißenden Begeisterung für die Wissenschaft jederzeit unterstützt und meine Arbeit nach dem Ausscheiden von Herrn PD. Dr. Rolf Kaiser im Labor betreut. Ohne ihn würde die Arbeit nicht in der jetzigen Form vorliegen.

Ich möchte mich bei den Kollegen der ehemaligen Toxikologie, allen voran bei Frau PD. Dr. Karen Hirsch-Ernst, für die Starthilfe beim Arbeiten mit Bakterienkulturen bedanken. Dr. Elke Oetjen und den Kollegen aus der Molekularen Pharmakologie danke ich für die Hilfe in Fragen zur Zellkultur und zu Gelshiftversuchen sowie für die problemlose Nutzung der Laborräume. Sonja Volland danke ich für das Überlassen von cDNA und RNA aus Neuroblastom-Zelllinien. Dank geht auch an Karoline Jobst für ihre Unterstützung bei Sequenzierarbeiten und an Bernd Zirk für die exzellente Computer-Administration während der gesamten Zeit der Doktorarbeit. Ich bedanke mich bei den zahlreichen Lesern, die mein Manuskript korrigiert haben, darunter auch meine Schwester Elisabeth. Ich danke allen Kollegen in der Klinischen Pharmakologie für die freundschaftliche Zusammenarbeit. Meiner Freundin Frauke Petry danke ich für fröhliche Laborstunden und stetiges Begleiten von Frust und Freude im Laboralltag. Ein herzliches Dankeschön auch an meinen Freund Thomas für sein Verständnis und an meine Familie.

Ganz besonders danke ich meinem Vater Dr. Henning Meineke. Sein Andenken und seine Idee von der Universität als Ort um die eigenen Grenzen unter dem Motto „*attempto*“ zu finden haben mich all die Jahre getragen.

Diese Arbeit wurde unterstützt durch ein Stipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft.